

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica



TESIS DOCTORAL

Determinación de las mutaciones *BRAF* en melanomas primarios y metastásicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cándida Ana Villanueva Álvarez-Santullan

Directores

**José Luis Rodríguez Peralto
Erica Riveiro**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN DE LAS MUTACIONES *BRAF* EN MELANOMAS
PRIMARIOS Y METASTÁSICOS**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Cándida Ana Villanueva Álvarez-Santullano

Bajo la dirección de los doctores:

José Luis Rodríguez Peralto

Erica Riveiro

Madrid, 2015

D. José Luis Rodríguez Peralto, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Dña. Erica Riveiro, Doctor en Medicina y Cirugía e investigadora del Grupo de Oncología Cutánea del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, adscrito al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

CERTIFICAN:

Que Dña. Cándida Ana Villanueva Álvarez-Santullano, Licenciada en Medicina y Cirugía, Especialista en Dermatología y Venereología Médico-Quirúrgica y en Alergología e Inmunología Clínica, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado **“Determinación de las mutaciones *BRAF* en melanomas primarios y metastásicos”**, dando nuestra conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, tras examinar y revisar los contenidos de dicho trabajo.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, se firma el presente certificado en Madrid.

Fdo: Dr. José Luis Rodríguez Peralto

Fdo: Dra. Erica Riveiro

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Rodríguez Peralto, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre y Profesor Titular de la Universidad Complutense de Madrid, por su generosidad como persona, médico y profesor, al haber confiado en mí para realizar este trabajo; a la Dra. Erica Riveiro, codirectora del trabajo por su colaboración, y a todos miembros de su equipo quiero expresarles mi agradecimiento.

Además, quería dar las gracias por su aportación a este proyecto a Yolanda Ruano, Federico Rojo, Rosa García, Alicia Maroto, Laura Nájera, Daniel Gómez, María Vázquez de la Torre, Minia Campos y Alberto Muro.

Este trabajo ha sido financiado gracias a la siguiente ayuda para la investigación:



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “ESTUDIO DE LA HETEROGENEIDAD INTRA- E INTER-TUMORAL DE LA MUTACIÓN $BRAF^{V600E}$ EN LA PROGRESIÓN TUMORAL DEL MELANOMA)”. FINANCIADO POR LA FUNDACIÓN MUTUA MADRILEÑA (MUTUA 2013). Investigador Principal: ERICA RIVEIRO.

- **ÍNDICE**
- **ABREVIATURAS**
- **ÍNDICE DE FIGURAS**
- **ÍNDICE DE TABLAS**
- **RESUMEN**

1. INTRODUCCIÓN	35
1.1. Aspectos históricos del melanoma	37
1.2. Epidemiología global y nacional	39
1.3. Clasificación, características clínico-patológicas y genéticas del melanoma	43
1.4. Estadificación	46
1.5. Alteraciones moleculares en las vías de transmisión de señal en el melanoma (Vía MAPK)	50
1.6. Oncogenes (<i>BRAF</i> y <i>NRAS</i>) y <i>c-Kit</i> en el melanoma	52
1.6.1. <i>BRAF</i>	52
1.6.2. <i>NRAS</i>	54
1.6.3. <i>c-KIT</i>	55
1.7. Métodos diagnósticos más habituales para la detección de la mutación <i>BRAF</i>	55
1.7.1. Secuenciación directa (Sanger®)	56
1.7.2. qRT-PCR	57
1.7.3. Inmunohistoquímica (IHQ)	58
1.7.4. Pirosecuenciación	58
1.8. Terapias clásicas del melanoma metastásico. Nuevas posibilidades terapéuticas	59
1.8.1. Ipilimumab	61
1.8.2. Inhibidores de PD-1 y PD-L1	61
1.8.3. Vemurafenib	62
1.8.4. Dabrafenib y Trametinib	64

1.9. Heterogeneidad inter e intra-tumoral. Resistencia a tratamientos (mecanismos de resistencia primaria y adquirida).....	66
1.10. Pronóstico asociado a la mutación BRAF	73
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
2.1. Hipótesis	77
2.2. Objetivos.....	77
3. MATERIAL Y MÉTODOS	79
3.1. Selección de casos	81
3.2. Muestras tisulares.....	81
3.3. Diseño del algoritmo diagnóstico para el estudio de heterogeneidad intertumoral	82
3.4. Manejo de la muestra y extracción de ADN para qRT- PCR y secuenciación directa	83
3.5. Cuantificación de ADN de cada muestra para el estudio	88
3.6. Análisis de la mutación mediante tres técnicas diagnósticas.....	88
3.6.1. Proceso de detección de la mutación <i>BRAF</i> ^{V600} a través de qRT-PCR (Cobas® 4800 Mutation Test).....	88
3.6.2. Proceso de detección de la mutación <i>BRAF</i> ^{V600E} mediante el anticuerpo monoclonal de ratón VE1.....	96
3.6.3. Secuenciación directa Sanger de los casos discordantes.....	97
3.7. Valoración de las muestras y análisis de heterogeneidad intratumoral mediante IHQ	99
3.8. Estudio estadístico de los datos obtenidos	100
4. RESULTADOS	107
4.1. Análisis descriptivo. Características clínicas e histopatológicas de la muestra 109	
4.2. Heterogeneidad intertumoral entre melanoma primario y sus metástasis mediante qRT-PCR de forma pareada (Cobas® BRAFV600 Mutation Test)	114

4.3.	Homogeneidad intertumoral entre melanoma primario y sus metástasis de forma pareada mediante IHQ.	117
4.4.	Estudio de casos discordantes entre dos métodos: Cobas® e IHQ; prueba <i>gold standard</i> : Secuenciación directa (Sanger®)	118
4.5.	Homogeneidad intermetástasis (MI; MII) en 22 pacientes con metástasis múltiples.....	125
4.6.	Homogeneidad intratumoral mediante IHQ.	129
4.7.	Asociaciones clínicopatológicas de la presencia de la mutación <i>BRAF</i> ^{V600} ..	130
4.8.	Grado de acuerdo entre qPCR frente IHQ	138
4.8.1.	Sensibilidad y especificidad para <i>BRAF</i> ^{V600}	138
4.8.2.	Valores predictivos para <i>BRAF</i> ^{V600}	139
4.8.3.	Coeficiente kappa ponderado para <i>BRAF</i> ^{V600}	139
4.8.4.	Medidas de sensibilidad, especificidad e índice de correlación kappa para la mutación <i>BRAF</i> ^{V600E}	139
4.9.	Análisis uni y multivariante para supervivencia global.....	141
4.10.	Análisis de la supervivencia global.....	142
4.11.	Análisis univariante para supervivencia libre de enfermedad	148
4.12.	Análisis de supervivencia libre de enfermedad	149
5.	DISCUSIÓN	157
5.1.	Características clínicopatológicas de los melanomas con mutación <i>BRAF</i> ^{V600} 159	
5.2.	Homogeneidad intertumoral de la mutación <i>BRAF</i> ^{V600E} mediante RT-PCR e IHQ entre melanoma primario y sus metástasis	164
5.3.	Homogeneidad intratumoral.....	169
5.4.	Reactividad cruzada de Cobas® <i>BRAV600 Mutation Test</i> e IHQ	173
5.5.	Sensibilidad y especificidad	176
5.6.	Valor pronóstico de la mutación <i>BRAF</i> ^{V600} (supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad).....	180
6.	CONCLUSIONES	185

7. BIBLIOGRAFÍA	189
8. ANEXO	205

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocoticotrópica
ADN	Ácido desoxirronucleico
ADN PBB	Tampón de la unión de ADN en parafina
ADN EB	Tampón de elución de ADN
ADN TLB	Tampón de lisis de tejidos de ADN
ADN SD	Diluyente para muestras de ADN
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
ARMS-PCR	<i>Amplification Refractory Mutation System-PCR</i>
BRAF OM	Mezcla de oligonucleótidos BRAF
BRAF MUT	Control de BRAF mutado
CDKN2A	Inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina 2A
CDK	Quinasas dependientes de ciclinas
CT	Tubos de obtención de muestras
DAB	<i>3,3'-diaminobezidina</i>
DHPLC	Cromatografía Líquida Desnaturalizante de Alto Rendimiento
ddPCR	<i>Droplet Digital PCR</i>
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
DTIC	Dacarbazina
EDTA	Ácido etildiaminotetracético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT	Tubos de filtrado con tampones

HE	Hematoxilina-eosina
HGF	<i>Hepatocyte Grow Factor</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
GC	Ganglio centinela
IHQ	Inmunohistoquímica
LDH	Lactato deshidrogenasa
LMM	Lentigo maligno melanoma
MI	Metástasis uno
MII	Metástasis dos
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MC1R	<i>Melanocortin 1 receptor</i>
MES	Melanoma de extensión superficial
MITF	Factor de transcripción asociado a microftalmia
MLA	Melanoma lentiginoso acral
MMX	Mezcla maestra de trabajo
MN	Melanoma nodular
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
MS-PCR	<i>Methylation-Specific PCR</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PK	Piruvato quinasa
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real Time-PCR</i>
RNMC	Registro Nacional de Melanoma Cutáneo
RTK	Receptores tirosina-quinasa
RXN MIX	Mezcla de reacción
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>

UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB I	Tampón de lavado de ADN I
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Silvestre

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema vía MAPK. Modificado de *“Molecular Pathology in Drug Discovery and Development”*. Edited by Suso Platero. Ed Wiley 2009 ISBN 978-0470-14559-3.
- Figura 2.** Estructura tridimensional de la unión PLX4032-BRAF^{V600}. Modificado de Bollag y cols. (2010).
- Figura 3.** Inhibición de BRAF quinasa por PLX4032, y los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia al tratamiento. Modificado de Davis y cols. (2012).
- Figura 4.** Esquema de tratamientos moleculares. *“Molecular Pathology in Drug Discovery and Development”*. Edited by Suso Platero. Ed Wiley 2009 ISBN 978-0470-14559-3.
- Figura 5.** Mecanismos de resistencia a los inhibidores de BRAF. Modificado de Lemech y cols. (2013).
- Figura 6.** Algoritmo diagnóstico de nuestro estudio.
- Figura 7.** Preparación de la muestra de ADN (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EE.UU.*).
- Figura 8.** Extracción de ADN (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EE.UU.*).
- Figura 9.** Nanodrop ND-2000 Espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).
- Figura 10.** Circuito del método diagnóstico *Cobas 4800 BRAF Mutation Test*. Modificado de Halait y cols. (2012).
- Figura 11.** Equipo cobas z480 y cobas 4800 V600 Mutation Test (Roche Molecular).
- Figura 12.** Equipo Ventana BenchMark GX (*Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ*).
- Figura 13.** Electroferogramas representativos del análisis de la secuenciación directa de la mutación BRAF (exón 15). A: BRAF^{V600E}. B: BRAF^{V600K}.
- Figura 14.** Casos representativos de la expresión del anticuerpo monoclonal de ratón anti-VE1. A: negativo. B: positivo-intenso-homogéneo.
- Figura 15.** Distribución de la muestra por sexo en nuestra serie (porcentaje).
- Figura 16.** Distribución de melanoma primario y metástasis en nuestra serie (porcentaje).

- Figura 17.** Distribución por tipo de metástasis en nuestra serie (porcentaje).
- Figura 18.** Distribución de melanomas con metástasis únicas y múltiples en nuestra serie (porcentaje).
- Figura 19.** Tipo de melanoma en la muestra (porcentaje).
- Figura 20.** Distribución por localización del melanoma primario en nuestros casos (porcentaje).
- Figura 21.** Ulceración e inflamación en el melanoma primario (porcentaje).
- Figura 22.** *Exitus* en nuestra muestra y muertes por melanoma (porcentaje).
- Figura 23.** Resultados representativos de secuenciación directa (Sanger®) positivos para las mutaciones V600E y V600K.
- Figura 24.** (A y B): Panel IHQ de casos discordantes.
- Figura 25.** Microfotografías representativas de anti-VE1.
- Figura 26.** Análisis de la supervivencia global de la muestra (meses).
- Figura 27.** Análisis de supervivencia global entre pacientes mutados BRAF^{V600} y no mutados (meses).
- Figura 28.** Análisis de la supervivencia global asociada al sexo (meses).
- Figura 29.** Análisis de la supervivencia global asociada al tipo de melanoma primario (meses).
- Figura 30.** Análisis de la supervivencia global asociada a la localización del melanoma primario (meses).
- Figura 31.** Análisis de la supervivencia global asociada al índice de Breslow (meses)
- Figura 32.** Análisis de la supervivencia global asociada al Nivel de Clark (meses)
- Figura 33.** Análisis de la supervivencia local asociada a la ulceración (meses)
- Figura 34.** Análisis de la supervivencia libre de enfermedad de la muestra (meses)
- Figura 35.** Análisis de la supervivencia libre de enfermedad asociada a la presencia de la mutación BRAF^{V600} (meses)
- Figura 36.** Análisis de la supervivencia libre de enfermedad asociada al sexo (meses)
- Figura 37.** Análisis de la supervivencia libre de enfermedad tipo de melanoma primario (meses)
- Figura 38.** Análisis de la supervivencia libre de enfermedad localización del melanoma

primario (meses)

Figura 39. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad asociada al índice de Breslow (meses)

Figura 40. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad asociado a nivel Clark (meses)

Figura 41. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad asociada a ulceración (meses)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Historia molecular del melanoma
Tabla 2.	Factores de riesgo en el melanoma
Tabla 3.	Genes asociados a mayor riesgo de melanoma hereditario. Modificado de Thompson y cols. (2009)
Tabla 4.	Clasificación TNM de melanoma cutáneo (AJCC). Modificado de Balch y cols. (2009)
Tabla 5.	Estadios de melanoma (AJCC). Modificado de Balch y cols. (2009)
Tabla 6.	Líneas de investigación de terapias dirigidas frente a melanoma
Tabla 7.	Mecanismos de resistencia primaria/intrínseca. Modificado de Spagnolo y cols. (2015)
Tabla 8.	Mecanismos de resistencia secundaria/adquirida. Modificado de Spagnolo y cols. (2015)
Tabla 9.	Distribución de las muestras tisulares
Tabla 10.	Categorías de la expresión de la inmunotinción del anticuerpo monoclonal primario de ratón VE1 en las preparaciones
Tabla 11.	Variables clínicas e histológicas (nº casos/%) estudiadas en nuestra muestra (n: 62)
Tabla 12.	Resultados de <i>Cobas BRAFV600 Mutation Test</i> concordantes <i>wild type</i>
Tabla 13.	Resultados de qPCR concordantes mutados
Tabla 14.	Casos discordantes mediante <i>Cobas BRAFV600 Mutation Test</i> (n: 10)
Tabla 15.	Resultados negativos IHQ
Tabla 16.	Resultados positivos IHQ
Tabla 17.	Concordancia de resultados discordantes entre qPCR e IHQ. Secuenciación directa
Tabla 18.	Número de individuos con gen mutado BRAF o WT en melanoma primario y metastásico.
Tabla 19.	Homogeneidad intermetástasis
Tabla 20.	Tabla de contingencia

-
- Tabla 21.** Distribución de la mutación $BRAF^{V600}$ en la muestra (melanoma primario y metástasis)
- Tabla 22.** Sexo y edad asociado a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$
- Tabla 23.** Localización del melanoma primario asociado a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$
- Tabla 24.** Localización de metástasis asociado a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$
- Tabla 25.** Tipo de melanoma asociado a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$
- Tabla 26.** Mediana del índice de Breslow (mm) asociada a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$
- Tabla 27.** Nivel de Clark asociado a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$
- Tabla 28.** Ulceración en el melanoma primario asociado a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$
- Tabla 29.** Inflamación en el melanoma primario asociado a la mutación $BRAF^{V600}$
- Tabla 30.** Edad y sexo asociados a melanomas con la mutación $BRAF^{V600K}$
- Tabla 31.** Localización del melanoma primario asociado a la mutación $BRAF^{V600K}$
- Tabla 32.** Localización y tipo de metástasis asociado a la mutación $BRAF^{V600K}$
- Tabla 33.** Tipo de melanoma asociado a la mutación $BRAF^{V600K}$
- Tabla 34.** Índice de Breslow del melanoma primario asociado a la presencia de la mutación $BRAF^{V600K}$
- Tabla 35.** Análisis uni y multivariante asociado a la supervivencia global
- Tabla 36.** Análisis univariante asociado a la supervivencia libre de enfermedad
- Tabla 37.** Heterogeneidad intertumoral
- Tabla 38.** Homogeneidad intertumoral
- Tabla 39.** Heterogeneidad intratumoral
- Tabla 40.** Homogeneidad intratumoral
- Tabla 41.** Frecuencia de la mutación $BRAF^{V600K}$ en la literatura
- Tabla 42.** Reactividad cruzada de anticuerpo VE1
- Tabla 43.** Sensibilidad y especificidad de la IHQ frente a otras técnicas moleculares

RESUMEN

RESUMEN:**INTRODUCCIÓN**

El melanoma es un cáncer cuya incidencia se ha incrementado en los últimos años, con una respuesta clínica decepcionante a los tratamientos convencionales con dacarbazina, interferón alfa-2b e interleucina-2, por lo que su supervivencia global no se ha modificado en absoluto.

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular y análisis genómicos, ha permitido la identificación de mutaciones y otras alteraciones genéticas y epigenéticas implicadas en el inicio y en la progresión del melanoma. El principal oncogén relacionado con la iniciación del melanoma es el v-raf sarcoma murino viral B1 homólogo (*BRAF*). La mutación puntual en el gen *BRAF* (predominantemente la V600E, donde la valina es sustituida por ácido glutámico en el aminoácido 600) se detecta en 40-60% de los pacientes con melanoma. Esta mutación es responsable de la activación constitutiva de la vía de la proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK) y la consecuente inducción de programas de proliferación y supervivencia celulares.

La aparición de los inhibidores de $BRAF^{V600E}$ ha generado un importante avance en el manejo de esta enfermedad. La justificación del uso de inhibidores selectivos contra estas proteínas oncogénicas, como $BRAF^{V600E}$, depende de que los tumores sean clonales con respecto al oncogén mutado (homogeneidad intratumoral) y que la mutación se mantenga en las metástasis originadas (homogeneidad intertumoral). Sin embargo, en la práctica clínica se ha detectado un alto porcentaje de recidiva tras el tratamiento. Por tanto, la identificación de nuevos mecanismos de resistencia tumoral es una cuestión que sigue sin respuesta, y la existencia de heterogeneidad de la mutación $BRAF^{V600E}$ en melanomas cutáneos, podría suponer un importante mecanismo de resistencia tumoral a los nuevos inhibidores de $BRAF^{V600E}$.

Algunos estudios publicados han demostrado en el melanoma la presencia de heterogeneidad intra-tumoral e inter-tumoral de la mutación $BRAF^{V600E}$. Aunque se

trata de un tema con gran transcendencia clínica, sigue estando muy poco estudiado. No existen en la literatura científica suficientes estudios, y las publicaciones presentes muestran resultados contradictorios, y han sido obtenidos con distintas metodologías.

Con el presente proyecto pretendemos profundizar en la comprensión de la heterogeneidad intra e intertumoral del melanoma, usando una técnica molecular (RT-PCR) y otra de no molecular (IHQ); pretendemos analizar el status *BRAF*^{V600E} en tumores primarios y metástasis múltiples de pacientes con melanoma y finalmente tratar de determinar la aplicabilidad de la técnica de inmunohistoquímica en la detección de *BRAF*^{V600E} en la rutina diagnóstica.

OBJETIVOS

El presente proyecto pretende estudiar la heterogeneidad de la mutación *BRAF*^{V600E} en melanoma en su progresión y la presencia de policlonalidad en el mismo tumor, y analizar la calidad de las técnicas utilizadas combinadas en un algoritmo diagnóstico que permitiría la identificación de pacientes con melanoma candidatos a tratamientos con inhibidores selectivos de una forma rápida y accesible.

Los objetivos concretos que proponemos son:

- Evaluar la heterogeneidad de la mutación *BRAF*^{V600E} intra e intertumoral del melanoma.
- Correlacionar los resultados del estado mutacional de *BRAF*^{V600E} con las características clínicopatológicas de los melanomas primarios cutáneos.
- Validar dos técnicas diagnósticas para el estudio gen *BRAF*^{V600E} (inmunohistoquímica y real time-PCR) y su combinación para el diseño de un algoritmo diagnóstico.
- Determinar la relevancia de la presencia de la mutación *BRAF*^{V600E} en el pronóstico de los pacientes que la poseen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el presente estudio se recopilaron de forma retrospectiva un total de 146 muestras (melanomas primarios cutáneos y metástasis) del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Los tejidos tumorales incluidos fueron 62 melanomas primarios, 42 metástasis cutáneas, 37 metástasis ganglionares y 5 metástasis viscerales. Se analizaron las muestras en paralelo, melanomas primarios y sus metástasis, mediante dos técnicas cualitativas: *Cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test* y la expresión inmunohistoquímica de la proteína BRAF^{V600E} a través del anticuerpo VE1.

Por último, los casos discordantes, es decir, aquellos en los que la mutación no se mantenía en los melanomas primarios y sus metástasis con las dos técnicas, fueron sometidos a secuenciación directa para BRAF exón 15 como técnica *gold standard*.

RESULTADOS

1. Heterogeneidad intertumoral entre melanoma primario y sus metástasis mediante qRT-PCR de forma pareada (*Cobas[®] BRAFV600 Mutation Test*).

La mutación BRAF^{V600} ha sido detectada en el 51,61% de los melanomas primarios y en el 57,14% de las metástasis. Se ha detectado un patrón discordante en el 16,12% de los casos analizados mediante esta técnica.

2. Homogeneidad intertumoral entre melanoma primario y sus metástasis de forma pareada mediante IHQ.

Todos los resultados analizados mediante IHQ entre melanoma primario y sus metástasis han sido concordantes. Por lo tanto, se ha demostrado homogeneidad intertumoral de la expresión de BRAF^{V600E} mediante IHQ (100%).

3. Concordancia entre dos métodos: *Cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test* e IHQ. Prueba *gold standard*: Secuenciación directa (Sanger[®]).

Los casos discordantes entre qRT-PCR e IHQ fueron sometidos a secuenciación directa

(Sanger®) del gen *BRAF* para el exón 15. Tres de los casos negativos por IHQ presentan la mutación *BRAF*^{V600K}. De las 146 muestras, 8 son V600K (5,29%). Todos estos casos son negativos por IHQ, mientras que qRT-PCR detecta 4 de los 8, un melanoma primario (nº: 30) y tres metástasis (nº: 40, 42).

4. Homogeneidad intratumoral mediante IHQ.

Todos los casos mostraron expresión de la proteína *BRAF*^{V600E} homogénea en toda la superficie tumoral de las preparaciones valoradas.

5. Asociaciones clínicopatológicas de la presencia de la mutación *BRAF*^{V600}

- La mutación de *BRAF* se presentó el 60,96% del total de los tumores analizados.
- La mediana de edad de diagnóstico de los pacientes que presentaban la mutación de *BRAF* ha sido menor comparada con aquellos pacientes sin mutación.
- La localización más frecuente asociada a melanomas que albergaban la mutación de *BRAF* ha sido el tronco.
- El subtipo histopatológico de melanoma más frecuente con estado mutacional *BRAF* positivo ha sido el MES.

6. Grado de acuerdo entre RT-PCR frente IHQ para la mutación de *BRAF*^{V600E}

- La sensibilidad del anticuerpo VE1 ha sido 95,78%, y la especificidad, 83,87%.
- El coeficiente kappa para la detección de la mutación V600E, excluyendo los casos con mutación V600K, ha sido 0,834 (Excelente).

7. Análisis de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad.

La presencia de la mutación de *BRAF* no ha demostrado ser un factor pronóstico independiente para la supervivencia global, ni para la supervivencia libre de enfermedad en nuestra muestra.

CONCLUSIONES:

1. La presencia de la mutación de *BRAF*^{V600} se ha observado en el 61,29% de los melanomas primarios de nuestra serie, siendo su perfil clínicopatológico

predominante melanomas de extensión superficial, localizados en el tronco y en pacientes jóvenes.

2. El estudio de la mutación de *BRAF*^{V600E} en muestras pareadas de melanomas primarios y metástasis mediante qPCR y el anticuerpo VE1, ha demostrado homogeneidad intertumoral.
3. La expresión de la proteína de *BRAF*^{V600E} mediante inmunohistoquímica es homogénea en todos los casos. No hemos observado heterogeneidad intratumoral de la mutación de *BRAF*^{V600E}.
4. La IHQ con el anticuerpo VE1 es una herramienta con una alta sensibilidad (95,78%) y especificidad (83,87%) para la detección de la proteína *BRAF*^{V600E}, cuando se compara con una técnica molecular, como qRT-PCR (*Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test*).
5. La presencia de la mutación de *BRAF*^{V600E} en pacientes con melanomas metastásicos, no es un factor pronóstico independiente, en la supervivencia global, ni en la supervivencia libre de enfermedad.

SUMMARY:

INTRODUCTION

Melanoma is a cancer whose incidence has increased in the last years, with a disappointing clinical response to conventional treatments (dacarbazine, interferon alfa-2b and interleukin-2).

The development of new molecular and genomic analysis techniques has allowed the identification of mutations and other genetic and epigenetic alterations involved in the initiation and progression of melanoma. The main oncogene associated with the initiation of melanoma is the v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (*BRAF*). A point mutation in the *BRAF* gene (predominantly the V600E, in which valine is substituted for glutamic acid at amino acid 600) is detected in 40-60% of patients with

melanoma. This mutation is responsible for constitutive activation of the protein mitogen activating kinase (MAPK) protein and the consequent induction of cell proliferation programs and survival.

The appearance of BRAF^{V600E} inhibitors has generated a significant advance in the management of this disease. The justification for the use of selective inhibitors against these oncogenic proteins, such as BRAF^{V600E} depends on whether tumors are clonal with respect to the mutated oncogene (intratumoral homogeneity) and whether the mutation is maintained in originating metastases (intertumoral homogeneity). However, in clinical practice a high rate of recurrence after treatment has been detected. Thus, the identification of new mechanisms of tumor resistance is a question that remains unanswered. The existence of heterogeneity in BRAF^{V600E} mutation in cutaneous melanomas, could be a major mechanism of tumor resistance to new BRAF^{V600E} inhibitors.

Some published studies have demonstrated the presence of melanoma tumor intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF^{V600E} mutation in melanoma. Although this is an issue with great clinical significance, it remains poorly understood. There are not enough scientific literature studies and current reports show conflicting results obtained with different methodologies.

In the present study, we intend to deep in the understanding of the intra- and inter-melanoma heterogeneity tumor using a molecular technique (RT-PCR) and other non-molecular technique (IHC); we analyze the BRAF^{V600E} status in primary tumors and multiple metastases of melanoma patients and finally try to determine the applicability of the immunohistochemical technique in detecting BRAF^{V600E} for routine diagnosis.

OBJECTIVES

This project study aims to determine the heterogeneity the status of the BRAF^{V600E} mutation in melanoma progression and the presence of polyclonality in the same

tumor, and analyze the quality of the techniques used combined in a diagnostic algorithm that would allow the identification of patients with melanoma who are candidates to treatment with selective inhibitors by the use of quick and accesible techniques.

The specific objectives proposed are:

- To examine the intra and intertumoral heterogeneity of the *BRAF*^{V600E} mutation in melanoma.
- To correlate the results of the mutational status of *BRAF*^{V600E} with clinicopathological features of primary cutaneous melanomas.
- To validate two diagnostic techniques to study *BRAF*^{V600E} mutation (immunohistochemistry and real time-PCR) and their combination for the design a diagnostic algorithm.
- To determine the influence of the *BRAF*^{V600E} mutation in patient prognosis

MATERIALS AND METHODS

A total of 146 samples (primary cutaneous melanomas and metastases) from the Department of Pathology, Hospital Universitario 12 de Octubre were retrospectively collected for the present study.

The tumor samples were 62 primary melanomas, 42 cutaneous, lymph node metastasis and 5 visceral metastases. A parallel study was conducted. Both primary and metastatic melanomas were analyzed using two qualitative techniques cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test and immunohistochemical expression of *BRAF*^{V600E} antibody protein through VE1.

Finally, discordant cases, that is, those in which the mutation was not maintained in primary and metastatic melanomas with the two techniques were subjected to direct sequencing of *BRAF* exon 15 as the gold standard technique.

RESULTS

1. Inter-tumoral heterogeneity among paired melanoma tumors by qRT-PCR analysis (*Cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test*).

The *BRAF*^{V600} mutation was detected in 51.61% of primary melanomas and 57.14% of metastases. In 16.12% of the cases, a discordant pattern was seen.

2. Intertumoral homogeneity between primary and metastatic melanoma form paired by IHC

All of the paired samples exhibited a consistent expression pattern of the *BRAF*^{V600E} mutation according to IHC analysis.

3. Concordance between two methods: *Cobas[®] 4800 BRAF V600 Mutation Test* and IHC. Gold standard test: Direct sequencing (Sanger[®])

Discrepancies between the qRT-PCR and IHC techniques were subjected to direct sequencing (Sanger[®]) of the *BRAF* gene for exon 15. Three IHC negative cases *BRAF*^{V600K} harbored the mutation. Of the 146 samples, 8 are V600K (5.29%). All these cases are negative by IHC, while qRT-PCR detected 4 of the 8, a primary melanoma (No. 30) and three metastases (number: 40, 42).

4. Intra-tumoral homogeneity of *BRAF*^{V600E} expression by IHC analysis.

All cases showed *BRAF*^{V600E} protein expression consistent across the surface of the assessed tumor preparations.

5. Clinicopathological features of *BRAF*^{V600}-mutated tumors.

- The *BRAF* mutation was detected in 60.96% of the analyzed tumors.
- The median age at diagnosis of patients with *BRAF* mutation at the diagnosis was lower compared to those patients without mutation.

- The most common location associated with melanoma harboring *BRAF* mutation was the trunk.

- The most common histological subtype of melanoma with *BRAF* mutational status was positive superficial spreading melanoma (SSM).

6. Comparison of IHC with the cobas® 4800 *BRAF*^{V600} Mutation Test for *BRAF*^{V600E} mutation detection.

- The sensitivity of VE1 antibody was 95.78%, and specificity, 83.87%.

- The kappa coefficient for detecting the mutation V600E, excluding cases with V600K mutations, was 0.834 (Excellent).

7. Analysis of overall survival and disease-free survival

The presence of *BRAF* mutation has not proven to be an independent prognostic factor for overall survival, or for disease-free survival in our sample.

CONCLUSIONS:

1. The presence of the *BRAF*^{V600} mutation was observed in 61.29% of primary melanomas in our series, and its clinicopathological profile showed a predominantly superficial spreading melanoma, located in the trunk and in younger patients.

2. The study of *BRAF*^{V600E} mutation in paired samples of primary and metastatic melanomas samples by qRT-PCR and antibody VE1, demonstrated intertumoral homogeneity.

3. The protein expression of *BRAF*^{V600E} by immunohistochemistry was homogeneous in all cases. We observed no intratumoral heterogeneity in *BRAF*^{V600E} mutation.

4. IHC with VE1 antibody is a useful tool with high sensitivity (95.78%) and specificity (83.87%) for the detection of protein *BRAF*^{V600E} protein, when compared with to a molecular technique, such as qRT-PCR (*Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test*).

5. The presence of the *BRAF*^{V600E} mutation in patients with metastatic melanoma is not an independent predictor factor of overall survival or disease-free survival.

1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos históricos del melanoma

El cáncer de piel es el más frecuente de todos los tipos de cáncer,¹ siendo el melanoma la neoplasia más agresiva de la piel. El melanoma es una neoplasia de origen neuroectodérmico, con diferenciación melanocítica que puede aparecer *de novo* (menos del 30%) en la capa basal de la epidermis y con menor frecuencia en la dermis, o asociada a una lesión melánica benigna preexistente.² La incidencia y la mortalidad del melanoma han aumentando de forma progresiva en las últimas décadas.³ Se ha convertido en un problema importante para la salud pública debido a su gran letalidad, al aumento de su incidencia y a la resistencia a los tratamientos. Hasta 2011, los tratamientos no habían demostrado un aumento de la supervivencia global. A partir de esta fecha, el panorama ha cambiado gracias a los avances en el conocimiento de la biología del melanoma y a las nuevas terapias.^{4,5}

La primera referencia sobre melanoma de la historia se recoge en el Papiro Ebers (1500 A.C.) y posteriormente, es Hipócrates, en el quinto siglo A.C., quien describe “tumores fatales negros con metástasis”. La palabra melanoma proviene del griego: *mélas* “negro” y el sufijo “oma” que significa tumor. La descripción inicial de melanoma como enfermedad se la debemos a René Laennec, quien la desarrolló en su artículo “The melanosis”.

En 1.820, William Norris presentó una familia con múltiples nevus, algunos de los miembros con lesiones metastásicas, y sugirió el carácter hereditario de algunos melanomas. El término melanoma fue propuesto por primera vez por Robert Carswell (1.838), y en 1.890, Jonathan Hutchinson describió el lentigo maligno que lleva su nombre. En 1.907, William Sampson Handley estudió las vías anatómicas de la diseminación del melanoma y la extensión linfática centrífuga. En 2006, Leboit y cols. publicaron la primera clasificación de la *World Health Organization* (WHO. *Classification of skin tumors*).⁶

Las opciones terapéuticas para estos pacientes han sido hasta ahora muy limitadas. La dacarbazina (DTIC) aprobada en melanomas metastásicos y el interferón para

melanomas de alto el riesgo de recidiva han sido prácticamente las únicas elecciones terapéuticas. En la última década, gracias al conocimiento molecular de la patogenia del melanoma, las expectativas de esta enfermedad han cambiado. El descubrimiento de las formas oncogénicas de *RAF* y *RAS* fueron clave para el conocimiento de la vía de señalización intracelular MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). La función de esta cascada de transducción de señales, es propagar la fosforilación al interior del núcleo de la célula provocando la proliferación, el crecimiento celular y angiogénesis.⁷⁻⁹ Los estudios en líneas celulares y muestras de tumores no cultivados demostraron una mutación recurrente en el exón 15 T1796A (conocido como T1799A en la secuencia de BRAF corregido) de la v-raf murino del sarcoma viral homólogo de oncogén B (*BRAF*) que produce la sustitución de valina por ácido glutámico en la posición 600 (V600E) en la quinasa BRAF.^{9,10} Las tres proteínas RAF funcionales en los seres humanos: ARAF, BRAF, y CRAF fueron descubiertas en 1986, 1988, y 1984, respectivamente, y son dependientes de la fosforilación.¹¹ En 2002, *BRAF* fue descubierto como oncogén humano.⁹ La forma V600E se identificó en el 50% de melanomas, el 15% de tumores tiroideos, y el 8% de tumores de colon, entre otros.

Las expectativas en el tratamiento del melanoma con la aparición de terapias moleculares, están cambiando la evolución de este cáncer. El primer inhibidor RAF en ensayos clínicos de cáncer fue sorafenib.¹² Los resultados *in vitro* fueron bastante prometedores, pero en líneas celulares y en estudios clínicos en monoterapia no cumplieron con las expectativas.¹³ En marzo de 2011, se aprobó ipilimumab por la FDA, para tratar a pacientes con melanoma diseminado. En noviembre de 2012, la Unión Europea (UE) aprobó ipilimumab para el tratamiento de segunda línea del melanoma metastásico. En agosto de 2011, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó vemurafenib, inhibidor selectivo de BRAF, y en febrero de 2012 hizo lo propio la *European Medicines Agency* (EMA). La FDA aprobó en mayo de 2013 dos nuevos medicamentos dabrafenib, inhibidor de BRAF, y trametinib, inhibidor de MEK (Tabla 1).

Tabla 1. HISTORIA MOLECULAR DEL MELANOMA

- **1983.** V-Raf oncogén de sarcoma murino viral homólogo B1
- **1984.** CRAF es una serina/treonina quinasa
- **1986.** ARAF
- **1988.** BRAF
- **1992.** RAF activa MAPK (MEK)
- **1993.** RAS-GTP activa RAF
- **2002.** BRAF se identificó como oncogén humano
- **2004.** Se determinó la estructura cristalina del dominio quinasa BRAF
- **2005.** Sorafenib fue aprobado por la FDA para carcinoma renal avanzado
- **2006.** Se inició la fase I de PLX4032 (vemurafenib)
- **2011.** Vemurafenib fue aprobado por la FDA para el tratamiento de melanoma metastásico
- **2012.** Vemurafenib fue aprobado en Europa

1.2. Epidemiología global y nacional

El melanoma es el cáncer de piel de mayor mortalidad.¹⁴ Su incidencia continúa aumentando, entre un 3-7% al año en la población de raza caucásica.^{15,16} La incidencia global es de 213.000 casos nuevos por año y de 27.000 muertes anuales (2015).¹⁷ El melanoma representa el 1,6% de los tumores malignos ocupando la 19ª posición. El *National Cancer Institute* (NCI) estimó que 76.690 estadounidenses serían diagnosticados de melanoma y 9.480 morirían de la enfermedad en 2013. La mayor incidencia se halló en Queensland (Australia) con 56 casos por 100.000 habitantes en hombres y 41 casos en mujeres.⁴ En Europa, la incidencia anual de melanoma es de 14 casos/100.000 habitantes, con casi 70.000 casos nuevos cada año siguiendo un claro gradiente norte-sur, con lo que, los países de la cuenca mediterránea tienen unas tasas inferiores de melanoma.

En España, los datos publicados en noviembre de 2013 por el Registro Nacional de Melanoma cutáneo (RNMC), mostraban 13.628 melanomas comunicados desde 1997, fecha de formación de este comité hasta 2011. La edad media de diagnóstico se establecía en 57 años en varones, y 56,5 años en mujeres. La localización más frecuente era el tronco (37,1%), seguida de las extremidades inferiores (27,3%). El tipo clínico-patológico más frecuente fue el melanoma de extensión superficial (MES) (62,6%).¹⁸ Las provincias con tasas más elevadas fueron Granada y Navarra. España fue el país europeo con menores tasas de incidencia.

En las áreas de alto riesgo (América del Norte, Australia y Nueva Zelanda), se ha visto una tendencia a la estabilización, probablemente justificada por el cambio en hábitos de exposición solar debido al incremento de la educación sanitaria en estos países (campañas informativas, prohibición de cabinas, ...).^{4,19} En Europa, la incidencia aumenta a un ritmo mayor que el de cualquier tumor sólido. Aunque las tasas de mortalidad están descendiendo gracias al diagnóstico en estadios iniciales.

El tratamiento precoz es esencial en el pronóstico de la enfermedad, ya que hasta la fecha, las terapias en su estadio avanzado son limitadas. La supervivencia a largo plazo en pacientes con metástasis a distancia es menor del 10% (NCCN 2013). La supervivencia media en pacientes con melanoma en estadio IV es de 8 a 18 meses. En Estados Unidos el año pasado, se proyectaron 8.700 muertes por melanoma, con una tasa estimada de mortalidad de 2,6 por 100.000.

La detección de los grupos de riesgo para el diagnóstico de melanoma es fundamental, con el fin de aplicar medidas preventivas dirigidas a la detección temprana de la enfermedad y corregir aquellos factores de riesgo modificables (Tabla 2).

Tabla 2. FACTORES DE RIESGO EN EL MELANOMA

- Historia personal y familiar de melanoma
- Fototipos I-II
- Múltiples nevus (más de 50)
- Síndrome de nevus atípico familiar
- Antecedentes de quemaduras solares intensas en la infancia
- Factores externos: exposición a radiación UV, utilización de cabinas de bronceado
- Inmunosupresión (VIH, quimioterapia, trasplante)
- Genodermatosis con potencial carcinogénico (Xeroderma pigmentoso)
- Factores genéticos: MC1R, CDKN2A,...

Los factores de riesgo que dependen del individuo son:

- Historia de melanoma previo (1-12% de los individuos desarrollarán un segundo melanoma) e historia familiar de melanoma.
- Número total de nevus melanocíticos y presencia de nevus displásicos (los pacientes con síndrome de nevus atípico familiar, tienen mayor riesgo de desarrollar un melanoma en comparación con la población general).

- Presencia de nevus congénitos gigantes. Se ha descrito que estas lesiones pueden desarrollar un melanoma hasta en un 5% de los casos. En los nevus pequeños y medianos, la transformación es más controvertida.
- Presencia de Xeroderma pigmentoso, una enfermedad autosómica recesiva, debida a un defecto en la reparación de ADN, en la que la radiación UV aumenta el riesgo de padecer melanoma.
- Otros factores como la inmunosupresión por diferentes causas (enfermedades, quimioterapia, trasplante, VIH, ..).

Un segundo grupo son los factores externos, y entre ellos la radiación UV proporcionada por la exposición solar que ejerce una acción directa mutágena sobre el melanocito.²⁰⁻²² Esta radiación afecta de forma individual, según las características fenotípicas de cada individuo (color de pelo, ojos, ...). La utilización de cabinas de bronceado también ha demostrado un aumento de riesgo de melanoma, carcinoma epidermoide y carcinoma basocelular.

Un tercer grupo son los factores genéticos (Tabla 2). Entre un 6-12% de los melanomas presentan un patrón familiar.²³ Se han identificado genes que se relacionan con susceptibilidad aumentada para el desarrollo de melanoma. Así, existen mutaciones que se caracterizan por expresarse con alta penetrancia, pero tienen baja prevalencia en la población general, y otras, cuyas variedades o polimorfismos son más frecuentes, pero tienen menor penetrancia.

- En los genes de baja penetrancia, uno de los más relevantes es el gen del receptor de la melanocortina (*MC1R*) que se localiza en el extremo telomérico del cromosoma 16q24.3,²⁴ y codifica un receptor transmembrana acoplado a proteína G expresado por muchos tipos celulares, incluidos los melanocitos de la piel. *MC1R* es el receptor de péptidos sintetizados en la glándula pituitaria, derivados de la proopiomelanocortina, como la MSH y ACTH. Ambos se unen con la misma afinidad a *MC1R*, activando una adenilciclase que incrementa la producción intracelular de

monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Este favorece la transcripción y traducción de tirosinasa, y de esta manera, la síntesis fotoprotectora de eumelanina y la proliferación melanocítica. Numerosos polimorfismos del gen *MC1R* se han aislado en la población mundial, sobre todo en la raza caucásica.²⁵

- Los genes de alta penetrancia, se detectan en familias con varios miembros con melanoma. Estos genes tienen un papel muy reducido en la mayoría de la población susceptible al melanoma. El melanoma familiar se define como la presencia de dos familiares de primer grado afectados de melanoma, o de más de dos si son de segundo grado. Esta definición de melanoma familiar, no está consensuada hasta la fecha actual.²⁶ El primero y más importante de estos genes de alta penetrancia es el gen *CDKN2A*, localizado en el cromosoma 9p21. Este locus tiene la particularidad de transcribir dos proteínas de forma alternante. Por un lado, es responsable de la codificación de p16, proteína de 16 kDa de peso molecular, que interviene en el control del ciclo y la apoptosis celular. El segundo producto de este locus, es p14 ARF, cuyo papel es regular el ciclo celular pero a través de una vía dependiente de p53. La proteína p16 se une e inhibe competitivamente a las quinasas dependientes de ciclina (CDK) 4 y 6, por lo que también aparece en la literatura médica como INK4a (inhibidor de la quinasa 4a) o p16^{INK4a}. De esta manera se impide la formación del complejo constituido por la unión de CDK4 y la ciclina D1, complejo necesario para la transición desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular mediante la fosforilación e inactivación del producto del gen del retinoblastoma.

	Cr.	Proteína	Función	P.	Fr.
Alto riesgo					
CDKN2A	9p21	P16INK4A, p14ARF	Regulación del ciclo celular, apoptosis	Alta	Baja
CDK4	12q14	Cinasa 4 dependiente de ciclina	Regulación del ciclo celular	Alta	Baja
Bajo riesgo					
MC1R	16q24	Receptor de melanocortina 1	Pigmentación	Baja	Alta
ASIP	20q11	Agouti signalling protein	Pigmentación	Baja	Alta
TYR	11q14	tirosinasa	Pigmentación	Baja	Alta
TYRP1	9p23	Proteína 1 tirosinasa relacionada	Pigmentación	baja	Alta

Tabla 3. Genes asociados a mayor riesgo de melanoma hereditario. Modificado de Thompson y cols. (2009).²⁷ Cr: cromosoma; P.: penetrancia; Fr.: Frecuencia (población)

1.3. Clasificación, características clínico-patológicas y genéticas del melanoma

La clasificación inicial de melanoma fue propuesta por Clark en 1973, basada en el patrón histopatológico, la localización del tumor, el tipo de exposición a la radiación UV, y la forma de crecimiento (fase de crecimiento radial y vertical).²⁸ Clark distinguió cuatro tipos principales de melanoma:

- Melanoma de extensión superficial (MES), el más frecuente en la raza caucásica (60-75%), con una edad media de aparición entre la 4ª-5ª década de vida. Las lesiones suelen ser circunscritas, de crecimiento asimétrico, adquiere diferentes colores y tonalidades. Se caracteriza por presentar una fase de crecimiento primero radial y a continuación vertical, con un patrón pagetoide.
- Melanoma nodular (MN), es el segundo en frecuencia en la raza caucásica (10-25%), sobre todo en varones y la localización más habitual es la espalda. La imagen clínica es una lesión papulosa de rápido crecimiento, a veces con escaso componente pigmentario. En su evolución, puede ulcerarse y sangrar. Estas lesiones por definición sólo presentan fase de crecimiento vertical.
- Lentigo maligno melanoma (LMM), corresponde al 5-10% de los melanomas, localizado en áreas de exposición solar crónica, en personas mayores (7ª-8ª décadas

de vida). La fase de crecimiento radial es muy prolongada y muestra un patrón de crecimiento lentiginoso.

- Melanoma lentiginoso acral (MLA) representa el 5-10% de los melanomas de la raza caucásica y es el más frecuente en la raza negra. El patrón histopatológico es característicamente lentiginoso.

En el año 2005, el grupo de Bastian y cols. demostró la existencia de relación entre los distintos tipos de melanoma con la exposición solar y los avances genéticos recientes en biología molecular. Maldonado y cols., en una muestra de 115 melanomas primarios, obtuvieron que la frecuencia de la mutación de *BRAF* era mayor en sujetos con exposición solar intermitente.²⁹ Sasaki y cols., en un estudio en líneas celulares, detectaron la mutación de *BRAF*^{V599E} en el 26% de los melanomas. La frecuencia de mutación entre los cuatro subtipos histológicos fue 50% en MES, y 33% en MLA, mientras que ninguno de los lentigos malignos, melanoma nodulares y melanoma de mucosa la presentaban.³⁰ Lang y cols., trataron de relacionar las bases genéticas con la clasificación clásica mediante el estudio de la mutación en el exón 15 del gen *BRAF* y, demostraron que la mayoría de las mutaciones de *BRAF* se hallaban en MES y MN.³¹ Curtin y cols., analizaron la mutación de *BRAF* y *NRAS* en 126 melanomas. Los dividieron en cuatro grupos: 30 melanomas asociados a daño solar crónico, 40 melanomas de pacientes con exposición solar intermitente, 36 melanomas acrales y 20 melanomas de mucosa. Encontraron diferencias significativas en la frecuencia de los cambios regionales en el número de copias de ADN y las frecuencias de mutación en *BRAF* entre los cuatro grupos de melanomas.³²

Liu y cols., valoraron las características clínico-patológicas de los melanomas invasivos primarios que contenían la mutación *BRAF*^{T1799A} en una muestra de 251 melanomas primarios invasivos. La mutación se encontró en 112 (45%) de los melanomas: la mayoría correspondían a MES, eran pigmentados, con escasos signos de daño actínico (queratosis solares, lentigos solares), estaban localizados en el tronco o extremidades, con un alto nivel de exposición a la percepción subjetiva de sol en la infancia, eran

menores de 50 años, mostraban un espesor tumoral bajo, bajo índice mitótico y puntuación baja de Ki67 y PH3. Los melanomas de piel con daño solar crónico mostraron características moleculares diferentes a los que surgían en piel fotoexpuesta de forma intermitente.³³ Estas características podrían determinar el comportamiento del tumor y el potencial de respuesta a los nuevos medicamentos.²⁷ Los melanomas en piel crónicamente dañada por el sol, piel acral, y mucosas portaban mutaciones de *KIT* en el 30% de los casos y mutaciones de *BRAF* en sólo el 15%.^{32,34} La mutación de *NRAS* ocurría en aproximadamente el 15% de los melanomas, pero no parece estar asociada a daño solar crónico o al área anatómica.³² Viros y cols., correlacionaron las características histomorfológicas conocidas y el estado mutacional de 302 melanomas cutáneos primarios. Demostraron que los melanomas con mutaciones de *BRAF* mostraban: engrosamiento de la epidermis, extensión pagetoide con formación de nidos de melanocitos intraepidérmicos, demarcación clara de la piel circundante, y células tumorales más redondas, grandes y pigmentadas. Un subgrupo de este estudio mostró un patrón metastásico diferente, con mayor tendencia a metastatizar a ganglios linfáticos regionales.³⁵ Long y cols., estudiaron la frecuencia y tipo de mutaciones de *BRAF* en el melanoma metastásico y las características clínico-patológicas. Obtuvieron que el 48% de los pacientes tenía una mutación de *BRAF* (V600E: 74%; V600K: 20% y el 6% tenían otros genotipos). Los melanomas que presentaban la mutación de *BRAF* eran fundamentalmente MES y MN, presentaban un mayor número de mitosis, eran melanomas primarios únicos, la ubicación predominante era el tronco, y la edad en el momento del diagnóstico del tumor primario era menor de 50 años. El intervalo de tiempo desde el diagnóstico de melanoma a la primera metástasis a distancia no fue significativamente diferente entre pacientes con o sin mutación. Sin embargo, la supervivencia media de los pacientes con melanoma metastásico fue de 5,7 meses para los pacientes con *BRAF* no tratados con un inhibidor de *BRAF*, y 8,5 meses para los pacientes sin la mutación de *BRAF*. Por lo que, la presencia de mutación de *BRAF* no tuvo impacto en el intervalo libre de enfermedad desde el diagnóstico de melanoma a la primera metástasis a distancia y sin embargo, pudo haber afectado la supervivencia.³⁶

Justificado por la existencia de resultados contradictorios en la prevalencia y las características clínico-patológicas de las mutaciones de *BRAF* y *NRAS* en el melanoma cutáneo primario. Lee y cols., a través de un metanálisis, evaluaron la frecuencia y la correlación clínico-patológica del melanoma cutáneo. Utilizaron los datos de estudios publicados entre 1989 y 2010. Las mutaciones de *BRAF* y *NRAS* se identificaron en el 41% y el 18%, respectivamente. Las mutaciones se asociaban con la localización y el subtipo histológico, pero no con la edad (al contrario que en estudios previos) y el sexo. La mutación de *BRAF* se detectó con frecuencia en pacientes con MES y en los melanomas en áreas de exposición solar intermitente. La mutación de *NRAS* era frecuente en los pacientes con MN y en los melanomas de piel dañada por el sol de forma crónica.³⁷

1.4. Estadificación

La estadificación permite identificar a aquellos pacientes que presentan un alto riesgo de desarrollar enfermedad avanzada, protocolizar las terapias y ofrecer información pronóstica. La estadificación del melanoma fue regulada en el año 2001, en la Sexta Edición del Manual de Estadificación del Cáncer, en una muestra de 17.600 pacientes, por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). El sistema de estadificación ha de tener en cuenta las características histológicas, biológicas y anatómicas del tumor primario, sus patrones de crecimiento local y de metástasis, así como la historia natural de la enfermedad. En el melanoma se utiliza el sistema TNM para describir la extensión anatómica de la enfermedad. Se basa en el análisis del tumor primario (T), donde se valora el grosor mediante el índice de Breslow, la ulceración y el índice mitótico. La afectación de ganglios regionales (N) y la presencia de metástasis a distancia (M) (Tabla 4). En 2009, se revisó esta clasificación y se amplió el tamaño de la muestra de la base de datos de melanoma y se agregó el índice mitótico, que demostró ser un factor pronóstico independiente, sobre todo en melanomas finos de menos de 1 mm. Se ha comprobado que la existencia de mitosis modifica la tasa de supervivencia sobre todo en estadios IB (Tabla 5). Así, la ausencia de mitosis supone una supervivencia de 95%, mientras que con la presencia desciende al 88%.³⁸

Otro tema controvertido en la estadificación es el estudio del ganglio centinela (GC). La biopsia del GC consiste en la extracción del primer ganglio linfático donde drena la zona de piel portadora del melanoma. Se realiza mediante la inyección de una sustancia radioactiva o un tinte azul cerca del tumor. Está indicado en todos los pacientes con melanomas primarios iguales o superiores a 1,0 mm de espesor y ganglios linfáticos regionales clínicamente normales. Aunque no existe consenso, se consideraría recomendando en melanomas T1 con ulceración del tumor primario, un índice mitótico superior o igual a $1/\text{mm}^2$, y nivel de Clark IV/V, si el índice de Breslow del tumor es mayor de 0,75 mm. Algunos autores usan este espesor tumoral como único criterio. La ulceración, el índice mitótico y el nivel de Clark serían relevantes en pacientes que no tienen una significativa comorbilidad, en pacientes menores de 40 a 45 años, o donde el índice de Breslow del tumor primario es incierto debido a los márgenes profundos tumorales positivos en la muestra de biopsia.^{38,39,40} El AJCC *Melanoma Staging Database* actualizada ha demostrado que el valores elevado de LDH sérica, es un factor predictivo independiente de la supervivencia en pacientes estadio IV.

Clasificación	Espesor (mm)	Ulceración/mitosis
Tis	NA	NA
T1	≤ 1,00	a: no ulcerado y mitosis <1/mm ² b: ulcerado o mitosis > 1/ mm ²
T2	1,01-2,00	a: no ulcerado b: ulcerado
T3	2,02-4,00	a: no ulcerado b: ulcerado
T4	>4,00	a: no ulcerado b: ulcerado
N	Nº de ganglios	
N0	0	NA
N1	1	a: micrometástasis b: macrometástasis
N2	2-3	a: micrometástasis b: macrometástasis c: metástasis en tránsito/ lesiones satélites sin ganglios metastásicos
N3	4+ ganglios afectos/metástasis en tránsito o lesiones satélites con ganglios metastáticos	
M	Localización	LDH (lactato deshidrogenasa)
M0	ausencia de metástasis a distancia	NA
M1a	metástasis cutáneas, subcutáneas o ganglionares a distancia	Normal
M1b	metástasis pulmonares	Normal
M1c	metástasis en otras vísceras metástasis a distancia	Normal Elevada

Tabla 4. Clasificación TNM de Melanoma cutáneo (AJCC). Modificado de Balch y cols. (2009)³⁸

Estadios de la AJCC en el melanoma							
Estadio clínico				Estadio patológico			
				T	N	M	
0	TisN0	M0		0	TisN0	M0	
IA	T1aN0	M0		IA	T1aN0	M0	
IB	T1b N0M0			IB	T1bN0	M0	
	T2a N0 M0				T2a N0 M0		
IIA	T2bN0	M0		IIA	T2b N0 M0		
	T3aN0	M0			T3aN0 M0		
IIB	T3bN0	M0		IIB	T3bN0 M0		
	T4aN0	M0			T4a N0 M0		
IIC	T4bN0M0			IIC	T4b N0 M0		
III	CualquierT N>N0 M0			IIIA	T1-4a N1a M0		
				T1-4a N2aM0			
	IIIB	T1-4b N1a M0					
		T1-4b N2a M0					
		T1-4a N1b M0					
		T1-4a N2b M0					
		T1-4ª	N2c M0				
		IIIC	T1-4bN1b M0				
	T1-4b N2b M0						
	T1-4b N2c M0						
Cualquier T N3 M0							
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Tabla 5. Estadios de melanoma (AJCC). Modificado de Balch y cols. (2009)³⁸

1.5. Alteraciones moleculares en las vías de transmisión de señal en el melanoma (Vía MAPK)

La vía de señalización intracelular MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), también conocida como vía RAS/RAF/MEK/ERK está encargada de transducir señales provenientes de la activación de una diversidad de receptores de factores de crecimiento, para convertirlos en eventos celulares. La señal se inicia tras la unión de los receptores de la membrana celular con su ligando. Tras la unión de los ligandos (factores de crecimiento a sus respectivos tirosin-quinasa), la dimerización del receptor desencadena su actividad tirosin-quinasa intrínseca, autofosforilando residuos de tirosina específicos de la porción intracelular de dichos receptores. Los receptores activan RAS mediante el reclutamiento de pequeñas proteínas adaptadoras citosólicas Grb-2 que se asocian a SOS (factor intercambiador de nucleótidos guanina-RAS) y convierte la proteína RAS, de RAS-GDP inactivo a RAS-GTP activo. Se produce la activación de RAS (proteína G pequeña), que presenta tres isoformas (NRAS, HRAS, KRAS). Estos forman complejos con proteínas RAF, y su forma activada fosforila MEK, que es una quinasa serina/treonina presente en dos isoformas (MEK1 y MEK2). La fosforilación de MEK activa su función como quinasa, cuyo sustrato es ERK (MAPK). ERK tiene dos isoformas: ERK1 (o MAPK3) y ERK2 (o MAPK1). ERK se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes relacionados con el crecimiento como c-fos y c-jun (Fig. 1). Estos dos factores de transcripción forman heterodímeros dando lugar a un complejo llamado AP1 que se une al ADN mediante secuencias consenso. AP1 controla la proliferación al regular la expresión de ciclinas como D1 y de proteínas reguladoras como p53 e inhibidoras como p21, p19 y p16. Las isoformas MAPK y MEK están presentes y son funcionalmente redundantes, al revés que RAS y RAF. La activación de ERK/MAPK induce esta serie de procesos mitogénicos y favorecedores de la supervivencia, mediante la interacción con sus múltiples sustratos citosólicos y la fosforilación de factores de transcripción. La activación de esta vía se amortigua por su propio mecanismo de regulación y, en ausencia de otros cambios oncogénicos, conduce a la senescencia.

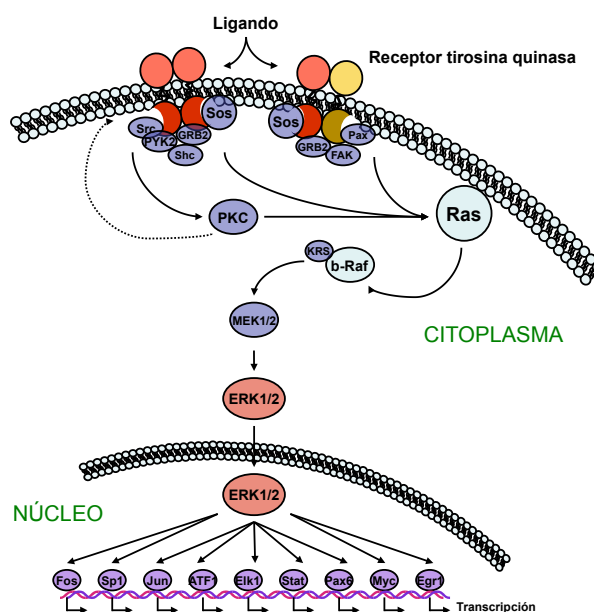


Figura 1. Esquema vía MAPK. Modificado de "Molecular Pathology in Drug Discovery and Development. Edited by Suso Platero. Ed Wiley 2009 ISBN 978-0470-14559-3"⁴¹

Las mutaciones activadoras de la serina/treonina quinasa del oncogén v-RAF sarcoma murino viral (*BRAF*) son frecuentes en los tumores humanos benignos y malignos.⁴² Alrededor del 5-7% de las neoplasias humanas presentan esta mutación. La mutación de *BRAF* está presente en el carcinoma papilar de tiroides, tumor seroso de ovario, carcinoma colorrectal, glioma, carcinoma hepatobiliar, histiocitosis, pólipos del intestino grueso, nevus melanocítico y la leucemia de células peludas.⁴³ En estos tipos de cáncer, se han notificado diversas alteraciones genéticas del proto-oncogén *BRAF*, tales como diferentes mutaciones puntuales y reorganizaciones cromosómicas. La mutación de *BRAF* se ha descrito en el 50% de los casos de melanoma (27-70%),^{9,44,45} entre el 40 y el 70% de los carcinomas de la tiroides, y hasta el 18% de los cánceres colorrectales. La mayoría de las mutaciones que se producen en *BRAF* aumentan la función de la quinasa (hiperfosforilación de MEK/MAPK), aunque existen otras formas menos comunes cuya capacidad de activar está reducida para fosforilar. Estas mutaciones implican la activación permanente de esta vía. Las mutaciones en *BRAF*

son fundamentales para iniciar el desarrollo de melanoma, pero no son suficientes para justificar la transformación definitiva de los melanocitos y su mantenimiento.^{46,47}

1.6. Oncogenes (*BRAF* y *NRAS*) y *c-Kit* en el melanoma

1.6.1. *BRAF*

El proto-oncogén *BRAF* (homólogo del oncogén del sarcoma viral murino: v-raf) codifica la quinasa BRAF, miembro de la familia de la RAF de serina/treonina quinasas citoplasmáticas. Las quinasas RAF son parte de la vía de señalización MAPK. El gen *BRAF* activa la cascada RAS/RAF/MEK/ERK implicada en la transducción de señales mitogénicas desde los receptores de membrana hasta el núcleo. En los melanocitos, la mutación de *BRAF* y por tanto, el aumento de actividad de la vía MAPK lleva a la ausencia de apoptosis e induce el avance en el ciclo celular, al estimular su proliferación y supervivencia. Otras consecuencias de la activación de las vías son: cambios en la secreción de factores proangiogénicos (VEGF), la regulación de MITF, la protección frente a la apoptosis mediada por FAS y la promoción de la invasión y metástasis. La mutación de *BRAF*^{V600E} es la más prevalente (90% de los casos de *BRAF*^{V600}). La mutación ocurre en la posición 600, produciéndose un cambio de una timina por una adenina en el exón 15, lleva a la sustitución de valina por glutamato (GTG a GAG). Existen más de 80 mutaciones en *BRAF* descritas.³⁶ Está codificada en el cromosoma 7q34.

La mutación de *BRAF* también está presente en alrededor del 80 al 90% de los nevus melanocíticos intermitentemente expuestos al sol.⁴⁸ Los nevus no siempre son precursores obligatorios, ya que la mayoría de los melanomas se desarrollan en la piel normal.⁴⁸ Solamente un 30% de los melanomas aparecen sobre lesiones pigmentadas preexistentes atípicas. Pollock y cols., estudiaron la mutación de *BRAF* en melanomas primarios (60), metástasis de melanoma (5) y nevus (77). En 63 (82%) de los nevus melanocíticos estudiados se identificó la mutación.⁴⁹ Uribe y cols., observaron que de los 22 nevus melanocíticos, 16 presentaban la mutación BRAF (73%), al igual que 11/23 nevus melanocíticos atípicos (52%) y 13/25 melanomas (52%). Estos hallazgos apoyan

la idea de que la mutación de *BRAF* no es suficiente por sí misma para la transformación maligna. Además, en este estudio no se identificó la mutación de *BRAF* en los queratinocitos periféricos, ni tampoco se encontró correlación entre la presencia de la mutación de *BRAF* con la edad, el nivel de Clark, o la exposición solar.⁴⁴ Poynter y cols., identificaron mutaciones de *BRAF* en el 82% de los nevus melanocíticos, en el 29% de los melanomas invasivos y en el 5,6 % de los melanomas *in situ*. La mayoría de las mutaciones de *BRAF* en melanoma invasivo primario fueron vistas en el MES (15/17), en áreas de exposición solar intermitente. Estos autores apoyan la evidencia de que la mutación activada está regulada positivamente en un gran porcentaje de lesiones melanocíticas, pero la mutación aislada no es suficiente para la transformación maligna, por lo que sugieren que *BRAF* contribuye a la hiperplasia melanocítica benigna, y es probable que contribuya al desarrollo de un melanoma invasivo sólo en combinación con otras mutaciones.⁴⁸ También se ha planteado que la mutación de *BRAF* es un evento temprano en la transformación melanocítica, ya que se han encontrado las mismas alteraciones tanto en el tumor primario como en el tejido metastásico. Las últimas observaciones llevarían a la hipótesis de que las mutaciones de *BRAF* en el melanoma son adquiridas durante el desarrollo de la enfermedad, sobre todo en las fases de enfermedad avanzada.^{50,51} En general, se considera que el tipo de melanoma que más frecuentemente presenta esta mutación es el MES,^{30-32,35,52} que se desarrolla en áreas intermitentemente expuestas al sol de pacientes mas jóvenes,^{29,33,53,54} y que son raros en los melanomas de piel expuesta crónicamente al sol, en piel acral o en mucosas.

La mutación de *BRAF* se distribuye uniformemente en diversos tipos de nevus. Su presencia en nevus congénitos y anogenitales manifiesta que existen otros mecanismos de inducción además de la exposición solar.⁵⁵ Su presencia ubicua sugiere que no representa una amenaza significativa de la transformación maligna, generando dudas sobre su relevancia en el desarrollo del melanoma y su idoneidad como un objetivo de la terapia dirigida en pacientes con melanoma.

La segunda mutación de *BRAF* en frecuencia es la mutación V600K. Se produce por la sustitución de valina por lisina (GTG a AAG).⁴⁵ La incidencia de V600K es de 6-38,6%.^{36,46,56-62} La localización más frecuente de la mutación *BRAF*^{V600} a la que se asocia es el tronco, y al estudiar la mutación *BRAF*^{V600K} de forma independiente, el tercio superior (cuello, cabeza), y también se ha relacionado con la exposición solar crónica. La mutación V600E se asocia con mayor predisposición que la V600K a la aparición de una primera metástasis a distancia.⁶⁰

1.6.2. *NRAS*

El primer oncogén de melanoma identificado fue *RAS*.^{63,64} La familia de proto-oncogenes *RAS* codifica proteínas trifosfato de guanosina (GTP)-dependientes, involucradas en la transducción intracelular de señales estimuladoras de la mitosis celular derivadas de la activación de los receptores de crecimiento y diferenciación. La isoforma *NRAS* es la más frecuentemente identificada en el melanoma (5-36%).⁶⁵⁻⁶⁷ En el resto de neoplasias, la más frecuente es *KRAS* (85%). Se ha relacionado con mayor exposición solar y aparece con más frecuencia en melanomas localizados en extremidades,^{37,66} aunque estas observaciones difieren según el estudio, el tipo y estadio de melanoma. Ambas mutaciones (*BRAF* y *NRAS*) son excluyentes entre sí. Son raras las mutaciones del resto de isoformas *RAS*. La mutación más frecuente es la que se produce por la sustitución de glutamato por leucina en la posición 61 (E61L) en el exón 2, seguida del exón 1 (codón 12). Como resultado, *NRAS* adquiere una activación constitutiva que induce la hiperactivación del sistema de MAPK.

Los pacientes en estadio IV que presentan esta mutación tienen peor pronóstico. Los melanomas con mutaciones *NRAS*, tienen un índice de Breslow mayor, aunque no parece estar relacionada con el número de mitosis o la presencia de ulceración en el melanoma primario.^{65,68}

La mutación *NRAS* es la segunda en frecuencia en el melanoma, detrás de *BRAF*. Sin embargo, *RAS* sigue siendo un objetivo difícil de alcanzar como diana terapéutica. Se han hecho intentos para inhibir la activación de *RAS* por el bloqueo de una

modificación post-transduccional. Estos inhibidores de RAS, producen toxicidades limitantes de dosis sin evidencia significativa de actividad antitumoral.⁶⁹ Las mutaciones BRAF y NRAS no se han identificado en el melanoma uveal hasta la fecha.⁷⁰

1.6.3. c-KIT

La proteína KIT fue inicialmente descrita como una oncoproteína codificada por un retrovirus del sarcoma felino. El proto-oncogén *KIT* codifica un receptor tirosina-quinasa cuyo ligando es el *stem cell factor* (SCF), factor de crecimiento fundamental para la hematopoyesis y para la formación de otros tipos de células, como los melanocitos y las células responsables de la motilidad intestinal.¹³ Es un proto-oncogén codificado en el cromosoma 4q11-12, próximo al gen del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y que codifica para una glicoproteína transmembrana como el receptor de tirosina quinasa. La activación de la mutación de *c-KIT* ha demostrado ser necesaria para el inicio de una serie de eventos de señalización para la proliferación celular y la propagación del cáncer. Los melanomas con mutaciones en el exón 11 ó 13 pueden responder favorablemente al tratamiento con imatinib u otros inhibidores de c-KIT. La activación de mutaciones, o amplificación del gen *KIT* se han encontrado en el 39% de melanomas de mucosas, el 36% de melanomas acrales, y en el 28% de los melanomas que se presentan en piel crónicamente dañada por el sol.^{69,71,32,72}

1.7. Métodos diagnósticos más habituales para la detección de la mutación BRAF

El descubrimiento de nuevas terapias en el melanoma obliga a la búsqueda de formas diagnósticas rápidas y eficaces para la detección de mutaciones en la actividad clínica diaria y la investigación. Actualmente, existen varios tipos de métodos de detección, aunque los más extendidos son la PCR cuantitativa, y la detección mediante anticuerpos de la proteína mutada. Estas técnicas tienen limitaciones. En la secuenciación de ADN, la sensibilidad es limitada ya que sólo se detecta la mutación si las células tumorales constituyen al menos un 5-10% de la muestra, si la muestra

tumoral es homogénea o si existe escasa infiltración de linfocitos, o células de sangre periférica. Es importante reducir el riesgo de resultados falsos negativos.⁷³

En los estudios clínicos se han utilizado múltiples métodos para el análisis de la mutación de *BRAF*^{V600} con diferentes rendimientos. Los más utilizados son la secuenciación Sanger, pirosecuenciación, qRT-PCR, Las sensibilidades de estos métodos diagnósticos son variables, y en algunos casos relativamente bajos. Así, por ejemplo, la sensibilidad de la técnica de secuenciación Sanger no es suficiente para el análisis de rutina, donde las muestras pueden contener altas fracciones de linfocitos o presentar pocas células tumorales en el estroma.⁷⁴ En la actualidad se está tratando de encontrar protocolos diagnósticos rápidos y baratos para la detección de la mutación *BRAF*.

1.7.1. Secuenciación directa (Sanger*)

La técnica de secuenciación de ADN Sanger fue desarrollada en 1975 por Frederick Sanger. Se basa en el proceso de replicación del ADN mediante el empleo de dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, esta cadena no puede continuar elongándose. Esto es así gracias a que la polimerasa necesita un grupo terminal 3' OH para añadir el siguiente nucleótido y el dideoxinucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo. Durante muchos años, la secuenciación de Sanger ha sido considerada el método de referencia para la identificación de mutaciones en los tumores. Sin embargo, tiene importantes limitaciones como su baja sensibilidad, ya que requiere un alto porcentaje de células tumorales, lo que dificulta su utilización como prueba de diagnóstico de rutina.

La secuenciación Sanger podría proporcionar información adicional en los casos negativos para la qRT-PCR, que a diferencia de la anterior sólo detecta, las mutaciones para las que fue diseñada.

1.7.2. qRT-PCR

La PCR en tiempo real (qRT-PCR), es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa. Se ha diseñado para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN). Una de estas formas automatizadas es el Test Cobas 4800 BRAF diseñado para procesar muestras en parafina mediante un par de cebadores complementarios y dos sondas de oligonucleótidos marcadas con diferentes colorantes fluorescentes: una sonda para detectar el tipo silvestre (WT) secuencia BRAF^{V600} y otra para detectar la secuencia de la mutación BRAF^{V600E}.⁷⁵ La concordancia entre el *Test Cobas 4800 BRAF* y la secuenciación de Sanger para la detección de V600E bidireccional es muy alta.⁷⁶

El *Test Cobas 4800 BRAF* ha demostrado reactividad cruzada con algunas otras mutaciones diferentes a la BRAF^{V600E}. Así, detecta el 70% de las mutaciones V600K, V600D, V600R, y V600E2.^{77,75} La asociación de la secuenciación Sanger para muestras con resultados de Cobas negativos aumenta la tasa de detección a 42,9% de mutaciones de BRAF. Este enfoque podría ayudar a maximizar el número de pacientes que se beneficiarían de tratamiento con un inhibidor BRAF.⁷⁸ Los resultados de los estudios que comparan las distintas técnicas son desiguales. En el trabajo de Anderson y cols., la qRT-PCR tuvo una tasa de fracaso de ensayo menor que la secuenciación Sanger, presentó mayor sensibilidad en la detección de la mutación, y detectó la mayoría de las mutaciones V600K, con resultados altamente reproducibles.⁷⁵ En el estudio de Colomba y cols., que compararon cuatro métodos: secuenciación Sanger, RT-PCR, inmunohistoquímica y pirosecuenciación. La sensibilidad de la real time-PCR BRAF fue superior a la secuenciación Sanger, pero inferior a la pirosecuenciación.⁷⁷

El *Test Cobas 4800 BRAF* es una prueba basada en una sonda de un solo oligonucleótido que tiene mayor sensibilidad analítica que la secuenciación de Sanger. Sin embargo, los hallazgos sugieren que su especificidad para una sola mutación de nucleótidos puede pasar por alto las mutaciones de dinucleótidos. La secuenciación Sanger puede detectar las mutaciones de un solo nucleótido y de dinucleótidos en la misma región, lo que explicaría su mayor tasa de detección. Esta diferencia es también

coherente con la relativa baja tasa de detección de otras sustituciones de dinucleótidos en el codón V600 por el método Cobas, como la mutación V600K.⁷⁸

1.7.3. Inmunohistoquímica (IHQ)

El anticuerpo monoclonal de ratón (VE1) contra BRAF^{V600E} permite la valoración de la proteína mutada en una muestra tumoral. La IHQ ofrece muchas ventajas, es más rápida, más barata y más accesible a todos los laboratorios. Se ha propuesto como método diagnóstico de primera línea por su alta sensibilidad y especificidad (sensibilidad: 97% y especificidad: 98%).^{77,79} La tinción es citoplasmática. La tasa de concordancia en los primeros estudios entre la IHQ (VE1) y secuenciación es muy alta 97,1%.⁴² La cantidad de material necesario para la detección con IHQ es menor que con la secuenciación, aunque la melanina endógena puede interferir en los resultados. Para evitar este problema, algunos protocolos recomiendan la utilización de fosfatasa alcalina. Los falsos negativos en la mayoría de los casos están producidos por la presencia de necrosis y en un número reducido de casos por la mala conservación de los tejidos.

Sólo se han observado falsos positivos en las células de la corteza suprarrenal que expresan ACTH, sin contener mutaciones de *BRAF*, lo que demuestra limitaciones de esta tinción en tejidos neuroendocrinos.^{80,81,82} En otros tumores, como el carcinoma colorrectal la IHQ no ha demostrado ser un método útil en el genotipado de esta mutación, ya que la sensibilidad ha sido muy inferior a la demostrada en el melanoma.⁸³ De hecho, en el momento actual, la inmunohistoquímica con VE1 no se considera un método adecuado como herramienta de cribado eficaz carcinoma colorrectal.^{83,84,85}

1.7.4. Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es un método estándar muy utilizado en la actualidad. Una de las desventajas es la necesidad de una alta calidad de preservación de los tejidos tumorales, sobre todo los tejidos embebidos en parafina. Tiene una sensibilidad del 100% (IC del 95%, 92,4% a 100%) y una especificidad (IC del 95%, 91,6% a 100%) para

la detección p.V600.⁷⁷ El coste, la organización del laboratorio, y el tiempo de entrega del resultado de pirosecuenciación en nuestras manos son similares a secuenciación de Sanger y qRT-PCR. Sin embargo, debido a que la IHQ es más barata y el resultado se obtiene fácilmente en un plazo de 48 horas, podría ser utilizado como primer análisis de *screening* sobre métodos diagnósticos como la pirosecuenciación. Los métodos moleculares con una sensibilidad más alta, tales como la secuenciación en paralelo masiva, deben ser evaluados en muestras para las que no es posible obtener >20% de las células tumorales.⁷⁷

1.8. Terapias clásicas del melanoma metastásico. Nuevas posibilidades terapéuticas

El tratamiento del melanoma se divide: en locorregional, en el que se incluye la cirugía y radioterapia, y sistémico (quimioterapia, inmunoterapia y tratamientos anti-diana). Los quimioterápicos activos en el melanoma son: alquilantes (dacarbazina y temozolomida), nitrosoureas (lomustina y fotemustina), análogos platino (cisplatino y carboplatino) y agentes que interaccionan con los microtúbulos (paclitaxel, docetaxel, vincristina, vinblastina y vindesina).

La dacarbazina (DTIC) es el tratamiento clásico más utilizado. Es un agente citostático alquilante, cuyo mecanismo de acción definitivo, no está bien determinado. Se aprobó por la FDA para tratamiento de melanoma metastásico en el año 2000. Se metaboliza en los microsomas hepáticos a monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC), un inhibidor de la incorporación de nucleósidos. MITC se descompone espontáneamente a 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC), un precursor purínico, y en un catión metildiazonio. La DTIC es el único agente de quimioterapia en monoterapia a probado por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico, se asocia a una tasa de respuesta del 7 al 12% y una mediana de supervivencia global entre 5,6 y 7,8 meses.^{86,87,88}

El interferón alfa y la interleucina-2 (IL-2) están aprobados para melanomas de alto riesgo de recurrencia. El interferón interviene en la división de las células cancerosas y

puede retrasar el crecimiento del tumor. La IL-2 trata de estimular la actividad del sistema inmune, frente el tumor. Ninguno de estos dos tratamientos ha demostrado beneficio en las supervivencia global. Los dos subtipos de IFN alfa existentes (2a y 2b) tienen actividad frente a la enfermedad y toxicidad similar. La monoterapia de interferón alfa produce un 15% de respuestas, de las cuales menos del 5% son completas. La duración del tratamiento es de 6 a 9 meses, con un máximo de 12 meses. No se emplea como agente único contra enfermedad diseminada, pese a que muestra cierto grado de actividad. Su empleo como tratamiento adyuvante ha sido aprobado, aunque sus resultados están lejos de ser óptimos. La IL2 es una interleuquina producida por los linfocitos CD4+. Induce la proliferación de células linfoides además de tener un importante papel en la regulación del sistema inmunológico. Su acción antitumoral se basa fundamentalmente en la activación y proliferación de linfocitos T.

En los últimos años se han aprobado nuevas líneas de tratamiento, y se sigue investigando en otras (Tabla 6)

Sobre las células tumorales	
1.	Inhibidores de receptores de superficie (EGFR, PDGFR, c-Kit)
2.	Inhibidores de proteínas de la cascada de las MAP quinasas (inhibidores de la farnesil transferasas-RAS; inhibidores de RAF e inhibidores de MEK)
3.	Inhibidores de la vía P13K/Akt (análogos de la rapamicina)
4.	Fármacos contra células apoptoicas (terapia antisentidoanti-bcl2)
5.	Inhibidores del proteosoma
6.	Terapias antiintegrinas (antagonistas de las integrinas, anticuerpos nanopatículas,...)
Localizadas en el entorno tumoral	
1.	Anticuerpos anti-VEGF o inhibidores
2.	Talidomida y derivados

Tabla 6. Líneas de investigación de terapias dirigidas frente melanoma

1.8.1. Ipilimumab

Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal indicado para el tratamiento del melanoma metastásico o irresecable, bloquea una molécula denominada antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4), que desempeña un papel importante en la supresión de la respuesta inmunológica normal frente al cáncer al potenciar la activación del linfocito T. El ipilimumab impide esa supresión y, por lo tanto, permite al sistema inmunológico responder frente a las células tumorales. Se ha asociado con una mejoría en la supervivencia global. Ha sido autorizado para el tratamiento del melanoma avanzado en adultos que ya ha recibido tratamiento previo. Además, ipilimumab está en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de pulmón, y el cáncer de próstata metastásico. La mayoría de los efectos adversos atribuidos a ipilimumab están basados en su mecanismo de acción sobre el sistema inmunitario, siendo los más comunes enterocolitis, hepatitis, dermatitis (incluyendo casos de necrólisis epidérmica tóxica), neuropatía y endocrinopatía. La mayoría de ellas al inicio del tratamiento.

La agencia FDA aprobó uso de ipilimumab sin necesidad de tratamiento previo con quimioterapia, en primera línea y en pacientes pretratados. En Europa, su aprobación sin embargo, exigió el fallo del tratamiento previo, y las dosis aprobadas fueron de 3 mg/kg (Julio de 2011). En octubre de 2013, la EMA extendió su aprobación a pacientes en primera línea.

1.8.2. Inhibidores de PD-1 y PD-L1

La expresión de PD-L1 (B7-H1) es uno de los mecanismos que utiliza el melanoma para evadir el sistema inmune. Esta molécula actúa de forma negativa en el sistema inmune acoplándose a PD-1 expresado por linfocitos activados e induce la apoptosis de estos. La expresión de PD-1 y de PD-L1 se asocia a peor pronóstico. A diferencia de los anticuerpos contra CTLA-4, los anticuerpos antiPD-1 o anti PDL-1 potencian la respuesta antitumoral dependiente de células T de un modo específico.

En la actualidad se están desarrollando varias moléculas en fase clínica III: lambrolizumab (MK-3475) y nivolumab (MDX 1106). Los resultados de los estudios han sido prometedores. Lambrolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 PD-1. La tasa de respuesta no fue diferente entre los grupos de pacientes tratados con ipilimumab (55%) y los no tratados previamente (42%).

Nivolumab es un anticuerpo monoclonal completamente humanizado tipo IgG4. En ASCO de 2013 se presentaron datos con nivolumab que mostraban tasas de respuesta de 30-40%, más de la mitad de respondedores se producía la respuesta antes de la octava semana post-tratamiento, la supervivencia global a 3 años era de 40%. Los pacientes con expresión de PD-L1 por IHQ tenían tasa de respuesta del 35% mientras que ninguno de los pacientes negativos presentaba respuesta.

1.8.3. Vemurafenib

Vemurafenib es el primer inhibidor selectivo eficaz de BRAF mutado. Actúa en la transducción de señales y está aprobado en melanoma avanzado o irresecable (Fig. 2). La dosis máxima tolerada es 960 mg dos veces al día. Los efectos secundarios más frecuentes descritos en esta dosis son: rash, fotosensibilidad, fatiga, artralgia, alopecia, queratoacantoma/carcinoma epidermoide (20%), náuseas y diarrea. Este tratamiento ha demostrado mejoría en la supervivencia global y la tasa libre de progresión en comparación con DTIC. En el ensayo fase II, la tasa de respuesta confirmada fue del 53%, con una duración media de la respuesta de 6,7 meses. A los 6 meses, la supervivencia global fue de 84% en el grupo de vemurafenib y 64% en el grupo de DTIC. El análisis intermedio de supervivencia global y definitiva para la supervivencia libre de progresión se asoció a una reducción relativa de 63% en el riesgo de muerte y 74% en el riesgo de muerte o progresión de la enfermedad, en comparación con DTIC. Las tasas de respuesta fueron del 48% para vemurafenib y 5% para DTIC. La duración media de respuesta fue entre 2 a 18 meses.⁸⁹

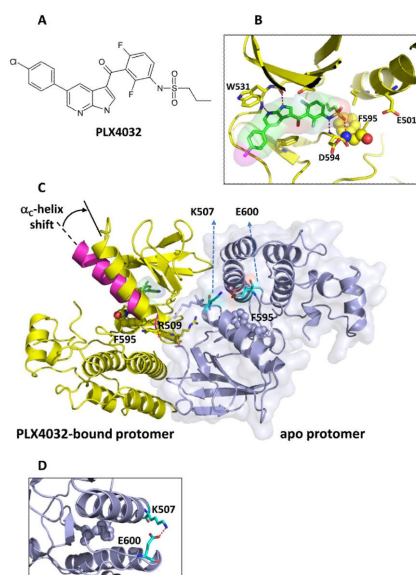


Figura 2. Estructura tridimensional de la unión PLX4032- BRAF^{V600E}. Modificado de Bollag y cols. (2010)⁹⁰

En el ensayo BRIM-3, los pacientes con BRAF^{V600E} presentaron una mediana de supervivencia global en el grupo de vemurafenib de 13,3 meses en comparación con 10,0 meses con el grupo de la DTIC, y la mediana de supervivencia libre de progresión fue de 6,9 meses en el grupo que recibió vemurafenib y 1,6 meses en los tratados con DTIC. Los pacientes que presentaban la forma BRAF^{V600K} (9%), la mediana de supervivencia global en el grupo de vemurafenib fue 14,5 meses, en comparación con 7,6 meses en el grupo DTIC y la mediana de supervivencia libre de progresión fue de 5,9 meses en los tratados con vemurafenib frente a 1,7 meses de los tratados con DTIC.⁹¹

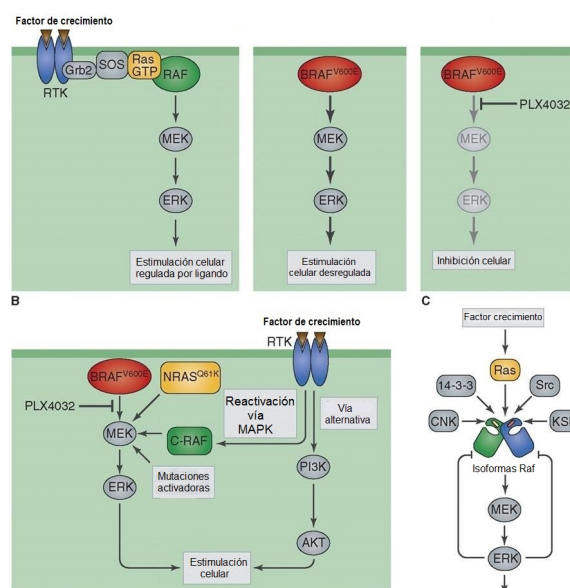
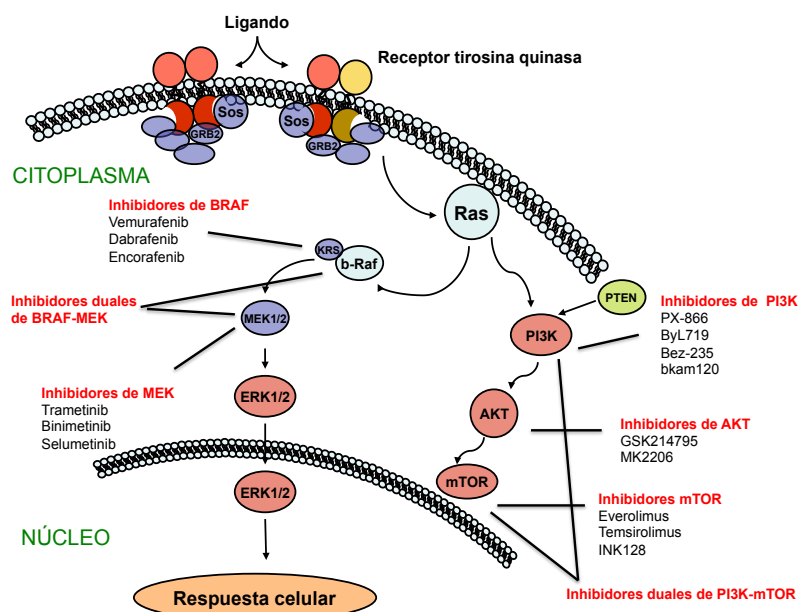


Figura 3. Inhibición de BRAF quinasa por PLX4032, y los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia al tratamiento. Modificado de Davis y cols. (2012)⁹²

Este tratamiento tiene limitaciones, ya que no todos los pacientes responden. Aunque la respuesta se inicia de una forma rápida y hay pacientes con respuestas duraderas, la duración mediana de la respuesta es 7 meses. Estos fenómenos de resistencia (primaria y secundaria) y de toxicidad han generado nuevas preguntas que han permitido conocer aun más la biología molecular del melanoma y generar hipótesis sobre como optimizar el tratamiento (Fig. 3).

1.8.4. Dabrafenib y Trametinib

Dabrafenib es un inhibidor de BRAF para tumores que expresan la mutación del gen $BRAF^{V600E}$, trametinib es un inhibidor de MEK para el tratamiento de pacientes con tumores que expresan $BRAF^{V600E}$ o mutaciones genéticas $BRAF^{V600K}$. Ambos fármacos fueron aprobados por la FDA en mayo de 2013 para pacientes con melanoma avanzado o irresecables. En Enero de 2014, dabrafenib y trametinib han sido aprobados como agentes en terapia combinada. Dabrafenib ha demostrado la mejora de la supervivencia libre de progresión. Los efectos secundarios descritos más frecuentes son la hiperqueratosis, cefalea, fiebre, artralgias, verrugas vulgares, alopecia y síndrome de eritrodisestesia palmo-plantar. Mientras que las reacciones



65

1.9. Heterogeneidad inter e intra-tumoral. Resistencia a tratamientos (mecanismos de resistencia primaria y adquirida)

La existencia o no de la heterogeneidad BRAF^{V600E} en tumores de melanoma tiene implicaciones en la práctica clínica oncológica diaria, ya que plantea la pregunta de si el grado de heterogeneidad intratumoral podría influir en la eficacia de las terapias molecularmente dirigidas contra BRAF mutado.⁷⁴ La existencia de diferencias en el estado de la mutación *BRAF* entre las células tumorales dentro del mismo melanoma primario (intratumoral), entre melanoma primario y la metástasis (intertumoral), o entre diferentes metástasis (intertumoral) dentro de la misma paciente se está estudiando en el momento actual y es un tema controvertido debido a la variedad de resultados en los estudios publicados.

Se ha objetivado heterogeneidad intratumoral de la mutación de *BRAF*^{93,94,95,96,97,98} e intertumoral^{95,99,98} con diversas técnicas moleculares y de expresión de proteínas. Así, Yancovitz y cols., mediante secuenciación convencional y MS-PCR, tras microdissección detectaron diferentes proporciones de células BRAF^{V600E} y células de tipo silvestre en diversas regiones del mismo melanoma en seis de nueve melanomas primarios que presentaban un resultado positivo para la mutación de *BRAF*^{V600E}. Lin y cols., tras aislar y secuenciar las células de cinco tejidos de melanoma primario, se encontraron que cuatro de los cinco melanomas primarios contenían células tumorales de tipo BRAF silvestre y mutado. Por lo que sugirieron, que la adquisición de la mutación no tendría que ser un evento fundador que podría formar parte de los múltiples eventos clonales en el desarrollo de un melanoma.⁹³ Busam y cols., utilizando un anticuerpo monoclonal BRAF^{V600E}, estudiaron 44 muestras con un estado de la mutación de *BRAF* conocido. Todas las muestras de melanoma que albergaban la mutación de *BRAF*^{V600E} fueron positivas con el anticuerpo VE1. Dieciséis se tiñeron fuertemente y de manera homogénea.⁹⁷ Capper y cols., en un estudio inicial en el que incluyeron 47 metástasis intracraneales de melanoma (2011), y posteriormente en 2012 en otro estudio en el que incluyeron melanomas primarios y sus metástasis, demostraron tinciones

inmunohistoquímicas muy homogéneas tanto en la expresión intratumoral como intertumoral.^{42,100} Boursault y cols., trataron de evaluar la heterogeneidad de la mutación de *BRAF* entre melanomas primarios y metastásico, a través de IHQ y secuenciación de Sanger, en 230 muestras en 99 pacientes con melanoma avanzado. La prevalencia de las mutaciones *BRAF*^{V600E} (45,2 %), *BRAF*^{V600E2} (3%), *BRAF*^{V600K} (3%) y otras minoritarias. La IHQ fue positiva en 109/112 muestras con mutaciones *BRAF*^{V600E/E2}. La tinción citoplasmática fue muy intensa en las células tumorales de los casos *BRAF*^{V600E} mutado. La concordancia entre ambas técnicas fue del 96,4%. La sensibilidad de la IHQ para detectar las mutaciones *BRAF*^{V600E/E2} fue de 97,3% y la especificidad fue del 100%. Ambas técnicas diagnósticas, la IHQ y el estudio molecular, demostraron una homogeneidad completa entre los melanomas primarios y metastásicos. Los autores propusieron que la IHQ podría ser un método de primera línea, más rentable para la detección *BRAF*^{V600E}. Así, proponían utilizar las técnicas moleculares solo en aquellos casos que presentasen resultados negativos, ambiguos o no valorables.¹⁰¹ Menzies y cols., en una muestra de 64 pacientes, estudiaron la heterogeneidad intrapaciente mediante IHQ, tanto intratumoral como intertumoral, con resultados claramente homogéneos en ambos casos.¹⁰² Algunos autores, sin embargo apuntan que la expresión heterogénea de *BRAF*^{V600E} en el melanoma podría explicar la progresión de la enfermedad y las recidivas que se observan en la mayoría de los pacientes tratados con inhibidores de la *BRAF*^{V600E}.^{89,103}

Otro problema es la aparición de resistencia temprana al tratamiento con inhibidores selectivos de *BRAF*. Se están estudiando diferentes mecanismos entre los que cabe destacar mutaciones secundarias o cambios epigenéticos en el gen diana, modificaciones en el metabolismo de fármacos, y la activación de las vías de compensación, lo que conduciría a un aumento de la supervivencia de las células tumorales.¹⁰⁴ Por otra parte, la heterogeneidad del tumor también podría promover problemas de diagnóstico en la práctica clínica y dificultades a la hora de selección de la muestra a analizar.

Los mecanismos de resistencia se dividen en dos grupos, intrínsecos (primarios) o

adquiridos. La resistencia intrínseca aparece en aproximadamente el 50% de pacientes tratados con vemurafenib (15% no muestran reducción del tumor, mientras que el 35% de los pacientes logran una reducción parcial). La resistencia intrínseca es rápida, se inicia en las primeras horas del tratamiento y es reversible (la eliminación del fármaco restablece la señal basal). En la resistencia adquirida (50%), los pacientes responde inicialmente (>30% de contracción del tumor) al tratamiento, pero posteriormente progresa la enfermedad. Esta, puede deberse a la adquisición de otra mutación o a la selección secundaria de una sola célula o pequeña subpoblación de células que albergan un alteración genética pre-existente que niega el efecto de los inhibidores de RAF. Las alteraciones de la resistencia adquirida produce cambios estables que pueden llevar a la resistencia irreversible e incluso al crecimiento del tumor que es dependiente del fármaco. Estas dos formas de resistencia a los tratamientos con inhibidores de BRAF no son excluyentes entre sí.^{105,106}

- Mecanismos de resistencia primaria (intrínseca)

La inactivación de genes supresores tumorales se cree que contribuye a la aparición de resistencia intrínseca. El gen de susceptibilidad al retinoblastoma (*pRb*) y *PTEN*, se han relacionado con la resistencia intrínseca a vemurafenib. En estudios en líneas celulares con mutación de *BRAF*^{V600E} y delección de *PTEN* se ha visto mayor resistencia al tratamiento con vemurafenib en comparación con homólogos con *PTEN* de tipo silvestre.^{107,108} Nathanson y cols., observaron en pacientes con melanoma *BRAF*^{V600E} con *PTEN* de tipo silvestre tratados con dabrafenib una mayor supervivencia libre de progresión en aquellos pacientes que albergan al menos un alelo mutado de *PTEN*.¹⁰⁹

Algunas alteraciones en la señalización RTK se han relacionado con mecanismos de resistencia intrínseca. La adición del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en líneas celulares de melanoma *BRAF*^{V600E} y su producción elevada por células del estroma han demostrado resistencia a vemurafenib a través de la activación del receptor c-MET de ERK1/2.^{110,111} Los niveles de HGF séricos elevados antes de un

tratamiento de vemurafenib son factores predictivos de la reducción en la supervivencia global.¹¹⁰

Los mecanismos de resistencia primaria pueden provocar a su vez una respuesta adaptativa como mecanismo de escape (Tabla 7). Se ha demostrado un aumento de FOXD3, en respuesta al tratamiento con vemurafenib.¹¹² Este aumento inducido en FOXD3 modifica la respuesta apoptótica al vemurafenib y mejora la apoptosis inducida por vemurafenib. Por otro lado, el aumento de FOXD3 en las células sensibles a inhibidor de la RAF proporciona protección frente a este fármaco.¹¹³ Lito y cols., estudiaron la retroalimentación de RTK y re-configuración de la ERK1/2 en un subconjunto de células de melanoma BRAF mutado. Demostraron la activación de ERK1/2 en presencia de inhibidores de RAF debido a la activación de RTK (ERBB/miembros de la familia HER). La reactivación de ERK estaba impulsada por RTK a través de Ras-GTP elevada, que inducía la formación de dímeros de RAF resistente a independencia de inhibidor de la RAF.¹¹⁴

Las respuestas primarias también pueden tener un impacto en otras vías. Haq y cols., observaron que el tratamiento con inhibidores de BRAF regula positivamente MITF y controla la expresión de PGC1 α .¹¹⁵ La fosforilación oxidativa se ha estudiado como un marcador de resistencia intrínseca. Las células con alto nivel de la desmetilasa H3K4, jumonji AT dominio rico interactivo 1B (JARID1B), presentan una mayor resistencia a vemurafenib.¹¹⁶

Alteración	Mecanismo de resistencia	Referencia
Mutaciones en RAC1 ^{P29S}	RAC1 regula la proliferación y migración celular	¹¹⁷
Sobreexpresión COT	COT activa ERK a través del mecanismo que no depende de la señalización de la RAF	¹¹⁸
Alteraciones en la señalización RTK	Activación de RTK puede indicar ya sea a través CRAF o a través de la vía PI3K	^{110,111}
Pérdida de NFI	NF1 es un gen supresor tumoral que inhibe la SRA; la inactivación de NF1 conduce a la activación de las vías de señalización corriente abajo de RAS, incluyendo PI3K / AKT y MAPK	^{119,120,121,122}
Desregulación de CDK4 y/o ciclina D1	Ciclina D1 se une CDK4 y CDK6, que a su vez fosforilan la proteína de retinoblastoma y conducen a la progresión del ciclo celular	^{123,109}
Pérdida de PTEN	PTEN es un gen supresor tumoral de la vía PI3K-AKT; su pérdida produce activación de AKT	^{109,124, 108,125}

Tabla 7. Mecanismos de resistencia primaria/intrínseca. Modificado de Spagnolo y cols. (2015)¹²⁶

- Mecanismos de resistencia adquirida/secundaria (Tabla 8)

Nazarian y cols., estudiaron los primeros mecanismos de resistencia que eliminaban el bloqueo de la señalización de BRAF^{V600E}. La regulación del receptor de la tirosina quinasa (RTK), PDGFR-β, y la expresión de NRAS^{Q61}.¹²⁷ Poulikakos y cols., (2011), descubrieron la coexistencia de NRAS con BRAF^{V600E} como un mecanismo de resistencia. Las mutaciones de *HRAS* (1%) y *KRAS* (2%) también pueden ser importantes en el ajuste de la resistencia adquirida a los inhibidores de la RAF.¹²⁸

La reactivación de ERK1/2 es un *splicing* alternativo de *BRAF*. Existe una forma 61 kDa de la BRAF^{V600E}, que carece de los exones 4-8 a partir de líneas celulares resistentes in vitro.¹²⁸ Esta forma posee mayor propiedad dimerización independientemente del estado RAS y activa MEK y ERK1/2 en presencia de vemurafenib. La amplificación del número de copias de BRAF^{V600E},¹²⁹ así como la activación de ciertas (C1215) mutaciones MEK1 también se han descrito como mecanismos de resistencia a vemurafenib.¹³⁰ Sin embargo, otras mutaciones MEK1 como las alteraciones P124S y I111S se han detectado en las muestras de pre-tratamiento y no ofrecen resistencia a los inhibidores de la RAF.¹²⁹

La sobreexpresión de receptores de membrana con actividad tirosina-quinasa (RTK), como el receptor del factor de crecimiento de la insulina (IGFR) o el receptor del factor de crecimiento de las plaquetas (PDGFR), ponen en marcha la cascada de transducción de señales, con activación de la vía AKT-mTOR, para en un paso final llevar al crecimiento tumoral, proliferación y supervivencia de la célula (Fig. 5).

La complejidad de estos mecanismos, hace necesarias estrategias personalizadas con una segunda línea de tratamiento o combinaciones de fármacos. En la actualidad, están previstas o en curso, varios ensayos clínicos para sostener los efectos de los inhibidores de BRAF y prevenir la resistencia, incluidos los ensayos que combinan los inhibidores de BRAF y MEK selectivos.

El campo del tratamiento del melanoma ha avanzado enormemente en la última década, dilucidar la biología de esta enfermedad mortal y los resultados clínicos alentadores son la prueba de que este trabajo está dando sus frutos. Tenemos muchas opciones y los agentes disponibles para la combinación de tratamientos y el aumento del conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen a la resistencia a fármacos facilitará el diseño de nuevas terapias de larga duración eficaces.

Alteración	Mecanismos de resistencia	Referencias
Incremento de RTKs	La activación de RTKs puede ser a través CRAF o de la vía PI3K	127,128,131,132,133
Mutaciones en NRAS	Las mutaciones activadoras NRAS (NRAS ^{Q61} , NRAS ^{T58} , NRAS ^{G13R}) favorecen la dimerización de RAF; la unión de los Inhibidores de RAF a los dímeros en transactivación alostérica del protómero libre de drogas y la activación de MEK/ERK	127
Mutaciones activadoras de MEK1/2	MEK1 está situado inmediatamente <i>downstream</i> de las proteínas RAF en la vía MAPK y promueve la fosforilación de ERK; MEK2 forma heterodímeros con MEK1 que activan ERK. Sólo algunas mutaciones se han asociado con la resistencia (MEK1 ^{C121S} , MEK1 ^{Q56P} , MEK1 ^{K57E} , MEK1 ^{E203K} , MEK1 ^{V60E} , MEK1 ^{G128V} , MEK2 ^{F57C} , MEK2 ^{C125S} , MEK2 ^{V35M} , MEK2 ^{L46F} , MEK2 ^{N126D})	117,134, 130, 135,136
Splicing alternativo BRAF^{V600E}	Debido a la alta propiedad de dimerización independientemente del estado de RAS, se activa MEK y ERK 1/2 fuertemente en presencia de un inhibidor de la RAF	128
Amplificación de copias BRAF^{V600E}	La reactivación MEK/ERK en una forma RAS y CRAF-independiente debido a un aumento de la expresión de BRAF	129
CRAF elevada	Los niveles elevados de proteína CRAF se han asociado a un incremento de los niveles de fosforilados ERK 1/2 y pueden explicar la adquisición de resistencia a BRAF debido al aumento de la dimerización RAF	137
Alteraciones de la vía PI3K-AKT	Las mutaciones en AKT1/3 (Q79K y E17K), en PI3K-AKT (PIK3CA y PIK3CG) y en los genes reguladores (PIK3R2 y PHLPP1) incrementan la señalización de la vía PI3K-AKT. La mutación AKT1 ^{A102V} no se ha asociado con la activación de AKT1	117,134, 138

Tabla 8. Mecanismos de resistencia secundaria/adquirida. Modificado de Spagnolo y cols. (2015)¹²⁶

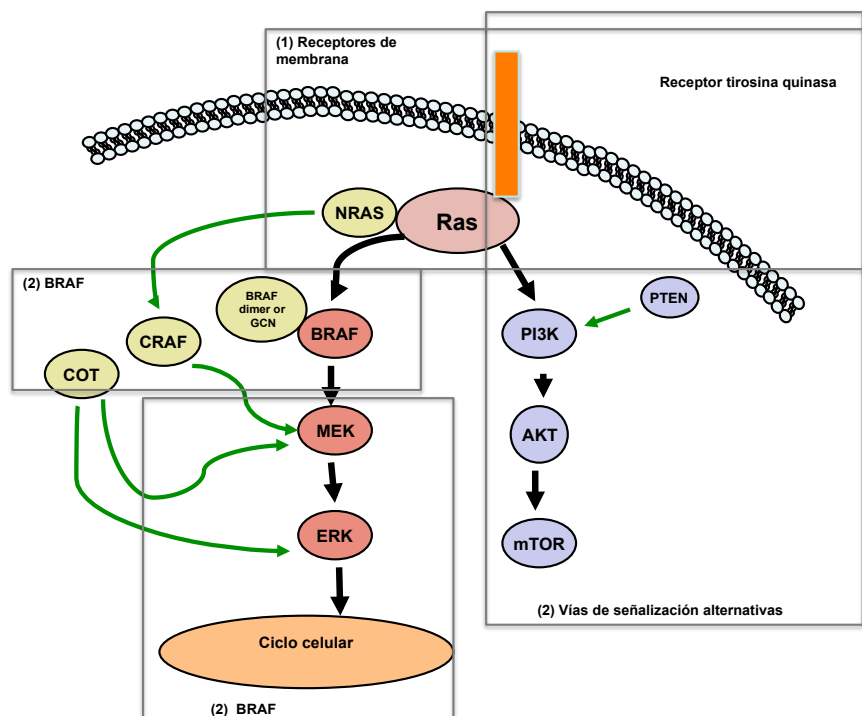


Figura 5. La figura muestra el sistema de clasificación de los mecanismos de resistencia de los inhibidores selectivos de BRAF Modificado de Lemech y cols. (2013)¹³⁹

1.10. Pronóstico asociado a la mutación *BRAF*

La mutación *BRAF* es un marcador de mal pronóstico en algunos tipos de cáncer como se ha descrito en el carcinoma papilar de tiroides y en el cáncer colorrectal.⁷⁹ La frecuencia de mutación *BRAF* en melanomas primarios oscila entre 36-45%^{32,33,46} y 42-55% en el melanoma metastásico.^{59,140,36} En el melanoma, la relevancia de la mutación *BRAF* en el pronóstico y en la progresión de la enfermedad todavía está en estudio con resultados contradictorios en las diversas publicaciones revisadas hasta la fecha.¹⁴¹ Se ha observado sin embargo, una tendencia a la disminución de la supervivencia en los pacientes con presencia de la mutación.^{36,142,143,144} Gracias a los hallazgos en la posible implicación en la progresión de este cáncer se ha propuesto la determinación de la mutación para ampliar las alternativas en la terapia adyuvante actual con la administración de inhibidores selectivos de *BRAF* y otros inhibidores de la vía MAPK.¹⁴⁴

La presencia de la mutación *BRAF* en el melanoma metastásico se ha asociado a una peor supervivencia desde el momento de la primera metástasis^{36,142} o al tiempo de la primera metástasis tras ser resecado,¹⁴⁰ aunque los estudios publicados hasta la fecha son muy limitados.⁵⁹ Barbour y cols., trataron de determinar los patrones de recurrencia de melanoma y la supervivencia en 124 pacientes en estadio III. Los pacientes con mutaciones *BRAF* presentaron mayor tasa de recidiva a los 3 años (77%) frente a un 54% en pacientes *BRAF* tipo silvestre.¹⁴³ Picard y cols., tras estudiar 72 melanomas en estadio III con ganglio centinela positivo, de los cuales 32 pacientes presentaban la mutación, concluyeron que la presencia de la mutación *BRAF* era un indicador de mal pronóstico en estos melanomas y propusieron que se incluyese la mutación en la estadificación.¹⁴² Long y cols., observaron que la supervivencia media de los pacientes estudiados con melanomas metastásicos recién diagnosticados fue de 5,7 meses para los pacientes con la mutación *BRAF* no tratados con un inhibidor de *BRAF* frente a 8,5 meses para los pacientes *BRAF* tipo silvestre.³⁶ Pero también existen trabajos con resultados en los que no se reproduce esta asociación.^{100,145,141,146}

Rurtkowsky y cols., en un amplio análisis molecular de melanomas en fase III revelaron que el estado mutacional *BRAF* y *NRAS* no era un marcador pronóstico en pacientes con melanoma en estadio III con afectación ganglionar macroscópica, pero podría tener implicaciones para la terapia adyuvante potencial. Por lo tanto son necesarios más trabajos con resultados reproducibles.¹⁴⁶

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

En el melanoma, el desarrollo de los inhibidores de $BRAF^{V600E}$ ha generado un importante avance en su manejo. Sin embargo, a pesar de que estos fármacos han demostrado un aumento de la supervivencia global, la aparición de resistencias a estas moléculas en un subgrupo de pacientes requiere la identificación de nuevos mecanismos tumorales que justifiquen la progresión de la enfermedad.

En la era de la terapia dirigida de inhibidores de proteínas oncogénicas, como en el caso de la mutación de $BRAF^{V600E}$, se parte de que los tumores metastásicos son clonales con respecto al oncogén mutado en el melanoma primario. En los últimos años, se han publicado algunos trabajos que cuestionan la permanencia de la mutación del gen $BRAF$ a lo largo de la progresión del melanoma. De hecho varios autores, han identificado heterogeneidad de dicha mutación en una serie de pacientes con melanoma. En nuestro estudio, se investiga la heterogeneidad intra e intertumoral en el melanoma con el fin de llegar a una mejor comprensión de esta enfermedad.

2.2. Objetivos

En el presente trabajo se han empleado dos técnicas diagnósticas para la detección de la mutación $BRAF^{V600E}$, con el fin de validar estas pruebas para la identificación de la mutación $BRAF$ en nuestra muestra compuesta por melanomas primarios y sus metástasis de forma pareada. El análisis de la calidad de ambas técnicas y su combinación para el diseño de un algoritmo diagnóstico de la mutación, permitirá la identificación de pacientes con melanoma candidatos a tratamientos con estos inhibidores selectivos de una forma rápida y accesible.

Por lo tanto, el presente proyecto pretende estudiar tres principales aspectos relacionados con la presencia de la mutación $BRAF^{V600E}$ en el melanoma: la heterogeneidad de la mutación $BRAF^{V600E}$ intra e intertumoral del melanoma, la validación de dos técnicas diagnósticas para el estudio gen $BRAF^{V600E}$ y su combinación

como algoritmo diagnóstico, y por último, la relevancia de la presencia de la mutación $BRAF^{V600E}$ en el pronóstico de los pacientes que la poseen.

Objetivos concretos

1. Correlacionar los resultados del estado mutacional $BRAF^{V600E}$ con las características clínicopatológicas de los melanomas primarios cutáneos.
2. Identificación de la heterogeneidad inter e intratumoral de la mutación $BRAF^{V600E}$ en melanoma. Estudiar la clonalidad de la mutación $BRAF^{V600E}$ en los tumores primarios y en sus metástasis, a través de la técnica qPCR e inmunohistoquímica.
3. Valorar la aplicabilidad clínica de la técnica de inmunohistoquímica del anticuerpo VE1 en la detección de la mutación $BRAF^{V600E}$.
4. Estudiar la mutación $BRAF^{V600}$ como factor pronóstico independiente que ayude en el manejo y en el tratamiento clínico de los pacientes.

3

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Selección de casos

Para el presente estudio se recopilaron de forma retrospectiva un total de 152 muestras de 65 pacientes con melanoma primario cutáneo y metástasis de la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre desde 1996, en donde fueron procesadas y estudiadas. El proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Hospital. De los 65 pacientes, 26 eran mujeres y 39 varones. Los criterios de selección fueron:

3.1.1. Criterios de inclusión

- Disponibilidad de tejido tumoral de muestras pareadas de melanoma primario y metástasis del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre.
- Pacientes con un único melanoma primario.
- Melanomas metastásicos (estadio I-IV de la AJCC, al diagnóstico).
- Bloques con representación tumoral superior al 10%.
- Pacientes mayores de 18 años en el momento de diagnóstico.
- Tipos de melanoma: MES, LMM, MN y ML.

3.1.2. Criterios de exclusión

- Melanomas de mucosas, uveales y formas raras.
- Metástasis y tumores primarios con escaso contenido tumoral y con abundante necrosis.
- Citologías (Ej: PAAF de metástasis)

3.2. Muestras tisulares

Una vez seleccionados los pacientes, se revisaron las historias clínicas de todos ellos y se recogieron los datos clínicos evolutivos que describiremos en el apartado “variables

a estudio recogidas”. De los 65 pacientes, fueron excluidos 3 por falta de disponibilidad de las muestras. La cohorte finalmente consistió en 62 pacientes, que aportaron al estudio un total de 62 tumores primarios y 84 tumores metastásicos. La edad de diagnóstico de melanoma estaba comprendida entre 23 y 87 años (mediana: 59,00 años). En 40 pacientes se estudió una sola metástasis y en 22 casos metástasis múltiples (2). Las metástasis fueron clasificadas como: piel, ganglio y visceral. Se reunieron un total de 146 muestras (Tabla 9).

MELANOMA PRIMARIO (nº)	METÁSTASIS única (nº)	METÁSTASIS múltiples (nº)
40	40	-
22	-	44
Total: 62	Total: 84	

Tabla 9. Distribución de muestras tisulares

Los tejidos tumorales incluidos en el estudio fueron 62 melanomas primarios, 42 metástasis de piel, 37 metástasis ganglionares y cinco metástasis viscerales (tráquea, bronquio, cerebro y dos de peritoneo). Las muestras estaban fijadas en formaldehído al 4% e incluidas en parafina. De todos los casos se disponía de una laminilla con varios cortes representativos del tumor en hematoxilina-eosina. Todas las preparaciones fueron revisadas con el fin de confirmar el diagnóstico de melanoma, describir el subtipo histológico, calcular el espesor de Breslow, nivel de Clark, inflamación y ulceración, y sus metástasis.

3.3. Diseño del algoritmo diagnóstico para el estudio de heterogeneidad intertumoral

A continuación, se analizaron las muestras en paralelo, melanomas primarios y sus metástasis, mediante dos técnicas cualitativas: *Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test* y la expresión inmunohistoquímica de la proteína BRAF^{V600E} a través del anticuerpo VE1. Se utilizó el mismo bloque de tejido para realizar ambos análisis.

Por último, los casos discordantes, es decir, aquellos en los que la mutación no se mantenía en los melanomas primarios y las metástasis del mismo paciente en las dos

técnicas, fueron sometidos a secuenciación directa Sanger para BRAF exón 15 como técnica *gold standar* entre las previas y de esta manera precisar la presencia o no de mutación y la posible identificación de otras mutaciones más infrecuentes (Fig. 6). Se utilizó el mismo ADN obtenido para qRT-PCR.

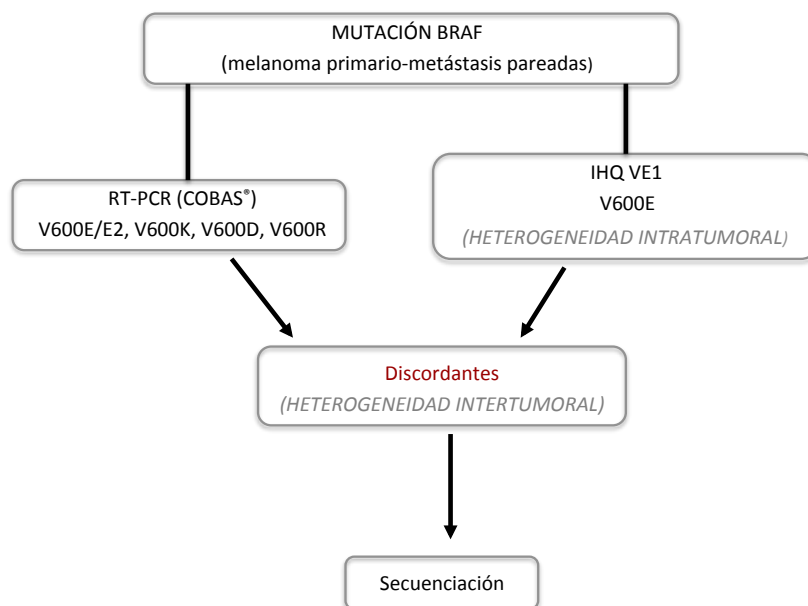


Figura 6. Algoritmo diagnóstico de nuestro estudio

3.4. Manejo de la muestra y extracción de ADN para qRT- PCR y secuenciación directa

Los cortes teñidos con hematoxilina-eosina fueron revisados por un patólogo y un dermatólogo, y así, escogimos los tejidos tumorales de mayor calidad para la extracción de ADN.

Para la preparación de las muestras y el aislamiento del ADN, se escogieron secciones que contenían un porcentaje de celularidad tumoral por encima del límite de sensibilidad de las técnicas utilizadas (qRT-PCR, Cobas® : un porcentaje mínimo de ADN mutado superior al 5%; porcentaje mínimo de células tumorales del 15%; muestras con un contenido tumoral superior al 15%. Se realizó macrodissección de las muestras con un contenido tumoral superior al 15%. Se realizó macrodissección de las muestras con un contenido tumoral superior al 15%, según recomendaciones del fabricante; Secuenciación

directa, Sanger®: porcentaje mínimo de ADN mutado >25%.^{76,147} Se realizó macrodissección si la proporción de células tumorales <60%.¹⁴⁷ Con el microscopio óptico identificamos las zonas tumorales que queríamos estudiar y las marcamos con un rotulador, evitando áreas con necrosis, inflamación y piel normal adyacentes (macrodissección).

Una vez seleccionados los bloques y macrodisecado el tejido tumoral, se obtuvieron con un micrótopo secciones de 5 μm de los bloques de parafina y se depositaron en tubos eppendorf. Cada corte fue recogido con ayuda de una aguja estéril e introducido en un tubo eppendorf estéril previamente rotulado que se mantuvo en una estufa a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ toda la noche. Si el tamaño del tejido tumoral era igual o mayor a 1 cm^2 , se incluía una sección, pero si la muestra era de un tamaño inferior se utilizaban más secciones. El ADN fue aislado mediante un kit de preparación de muestras basado en la unión del ADN a fibras de vidrio (Cobas® DNA Sample Preparation Kit, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EE.UU.) (Fig. 7).



Figura 7. Preparación de la muestra de ADN (Cobas® DNA Sample Preparation Kit, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EE.UU)

Cada sección de 5 μm fue desparafinada con xileno y etanol:

- Colocamos cada sección de 5 μm de las muestras fijadas con formaldehído e incluidas en parafina, en un tubo de 1,5 ml etiquetado con la información de identificación de la muestra.

- Se añadió 500 µl de xileno.
- Se agitó durante 10 segundos.
- Dejamos el tubo durante 5 minutos a 15°C-30°C.
- Añadimos 500 µl de etanol absoluto y agitamos la mezcla durante 10 segundos.
- Se dejó el tubo durante 5 minutos a 15°C-30°C.
- Se centrifugó la mezcla a 16.000 x g a 20.000 x g durante 2 minutos y eliminamos el sobrenadante. Se aspiró el sobrenadante desde arriba hacia abajo, siguiendo el nivel del líquido, con una micropipeta de precisión.
- Añadimos 1 ml de etanol absoluto y agitamos durante 10 segundos.
- Se centrifugó a 16.000 x g a 20.000 x g durante 2 minutos y eliminamos el sobrenadante.
- Secamos el precipitado de tejido durante 10 minutos a 56°C en un bloque de calentamiento con los tubos abiertos.
- Resuspendimos el sedimento de tejido en 180 µl de tampón de lisis de tejido de ADN (ADN TLB) 1 x 10 mL (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit*): Tampón Tris-HCL + Cloruro potásico + 0,04% EDTA + 0.1% Triton X-100 + 0,09% azida sódica.

Las secciones desparafinadas se sometieron a lisis con PK. A continuación, fueron purificadas por centrifugación a través de una columna con un filtro de fibra de vidrio y eluídas en una solución acuosa:

- Añadimos 70 µl de PK reconstituida (se añade 4,5 ml de agua estéril (grado PCR) mediante una pipeta serológica estéril y desechable de 5 ml. Se invirtió la mezcla entre 5 y 10 veces. Se transfirió una parte alícuota de 450 µl de PK reconstituida a tubos para microcentrífuga Safe-Lock de 1,5 ml y se almacenó a -20°C. Se descongeló el número suficiente de alícuotas para

- procesar el número de muestras que se iban a analizar (se requieren 70 µl de PK reconstituida para cada muestra). PK
- liofilizada 1 x 100 mg (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit*).
 - Agitamos la mezcla muestra /DNA TLB (Tampón de lisis del tejido de ADN) 1 x 10 mL (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit*): Tampón Tris-HCL + Cloruro potásico + 0.04% EDTA + 0.1% Triton X-100 + 0.09% azida sódica /mezcla de PK durante 30 segundos.
 - Colocamos el tubo en un bloque de calor seco a 56 °C y se incubó durante 60 minutos.
 - Agitamos el tubo durante 10 segundos.
 - Colocamos el tubo en el bloque de calor seco a 90 °C y se incubó durante 60 minutos.
 - Se enfrió a 15°C-30°C. Después de enfriar la mezcla, se centrifugó a pulso para recoger el exceso de líquido de la tapa.
 - Añadimos 200 µl de ADN PBB (Tampón de unión de ADN en parafina) 1 x 10 mL (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit*): Tampón Tris-HCL + 49,6% Clorhidrato de guanidina + 0,05% Urea + 17,3% Triton X-100 y lo mezclamos pipeteando 3 veces de arriba a abajo. Se incubó a 15°C -30°C durante 10 minutos
 - Añadimos 100 µl de isopropanol en cada tubo y se mezclamos el lisado pipeteando 3 veces de arriba y abajo.
 - Transferimos todo el lisado a la unidad de FT (tubos de filtrado con tapones) /CT (tubos de obtención de muestras).
 - Centrifugamos FT/CT a 8000 x g durante 1 minuto.
 - Colocamos cada FT en un nuevo CT y se desechamos el flujo a través de la CT.
 - Añadimos 500 µl de WBI (tampón de lavado de ADN I) 1 x 25 mL (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit*): Tampón Tris-HCL + 64% Hidrocloruro de guanidina (Fig. 8).
 - Se centrifugó FT/CT a 8000 xg durante 1 minuto.

- Colocamos FT en un nuevo CT. Desechamos el flujo a través de la antigua CT.
- Se centrifugó FT/CT en 16.000 a 20.000 x g durante 1 minuto
- para secar la membrana de filtro.
- Colocamos el tubo de FT en un tubo de elución (1,5 ml tubo de microcentrífuga) pre-etiquetados con la identificación de la muestra. Desechamos el flujo.
- Añadimos 100 µl de ADN EB (Tampón de elución de ADN) 1 x 6 mL (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit*): Tampón Tris-Hcl + 0,09% azida sódica en el centro de la membrana FT sin tocar la membrana FT.
- Se incubó FT con el tubo de elución a 15°C-30°C durante 5 minutos.
- Se centrifugó FT con el tubo de elución a 8.000 x g durante 1 minuto para recoger la elución en el tubo de elución (pre-marcado de microcentrífuga de 1,5 ml tubo). Desechamos la FT utilizada.
- Cerramos las tapas de los tubos de elución.



Figura 8. Extracción de ADN (*Cobas® DNA Sample Preparation Kit*, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EE.UU)

3.5. Cuantificación de ADN de cada muestra para el estudio

La cuantificación y valoración de la calidad de ADN genómico fue determinada a partir de lecturas duplicadas a 260 nm (las dos medidas debían estar entre $\pm 10\%$ cuando la concentración de ADN era $\geq 20,0$ ng/mL. Para lecturas $< 20,0$ ng/l, las dos medidas debían estar dentro de ± 2.0 ng/mL), con un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) La calidad de las muestras: ratios 260/280 de 1,8. El índice de pureza del 260/230 del ADN en el rango de 1,8-2,2 (Fig. 9)

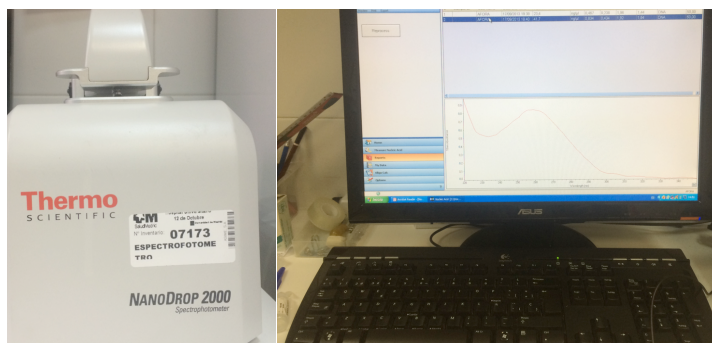


Figura 9. Nanodrop ND-2000 Espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE)

3.6. Análisis de la mutación mediante tres técnicas diagnósticas

3.6.1. Proceso de detección de la mutación BRAF^{V600} a través de qRT-PCR (Cobas® 4800 Mutation Test)

La qRT-PCR (Cobas® 4800 Mutation Test), es una prueba cualitativa *in vitro* para la detección de la mutación BRAF^{V600E}. El sistema se encarga de amplificar el fragmento de ADN diana mediante PCR e hibridación de ácidos nucleicos para detectar la mutación V600E. El equipo utiliza cebadores que definen una secuencia de pares de 116 bases de la región genómica humana que contiene V600E en el exón 15 del gen *BRAF*. Está diseñado para detectar el cambio T>A del nucleótido 1799 en el gen *BRAF* que se traduce como el cambio de valina a ácido glutámico en el codón 600 (V600E).

El gen *BRAF* no se amplifica en su totalidad. La amplificación por PCR del ADN diana se realiza mediante un par de cebadores (*primers*) complementarios y dos sondas de

oligonucleótidos marcadas con diferentes colorantes fluorescentes (sondas TaqMan). Una sonda está diseñada para detectar la secuencia BRAF^{V600} de tipo silvestre y otra está diseñada para detectar la secuencia de BRAF^{V600} mutada. Se proporcionan dos controles de ejecución externos, y un alelo de tipo silvestre sirve como control interno para el proceso completo. La secuencia de tipo silvestre y la V600E se detectan por canales ópticos adaptados. La placa de sellado se carga en el sistema Cobas 4800 v2 para la detección automatizada de PCR en tiempo real (Fig. 10).



Figura 10. Circuito del método diagnóstico Cobas 4800 BRAF Mutation Test. Modificado de Halait y cols. (2012)⁷⁶

3.6.1.1. Amplificación del fragmento diana.

Se calcula la dilución para el stock de ADN de la muestra 5 µl de una dilución de 5 ng/µl de stock de ADN (125 ng en total), mediante estas fórmulas:

- *Volumen de stock de ADN requerido = (35 µl x 5 ng/µl)/concentración de stock de ADN en ng/µl*
- *Volumen de ADN SD (diluyente para muestras de ADN) requerido en µl = (35 µl – volumen de stock de ADN requerido en µl). ADN SD 2 x 1 ml: T ampón Tris-HCl + 0,09% de azida sódica*

La dilución de las muestras se realizó,

- Con una pipeta con punta resistente a aerosoles, pipeteamos el volumen calculado de diluyente para las muestras de ADN SD en los tubos etiquetados para microcentrífuga Safe-Lock de 1,5 ml para diluciones de *stock* de ADN de muestras.
- Se agita cada *stock* de ADN de muestra durante 10 segundos.
- Con una pipeta con punta resistente a aerosoles, pipeteamos con cuidado el volumen calculado de cada *stock* de ADN de muestra en el tubo etiquetado correspondiente que contenga ADN SD. Utilizamos una punta de pipeta de precisión nueva para cada muestra.
- Tapamos y mezclamos cada *stock* de ADN de muestra diluida mezclándolos durante 10 segundos.

Preparación de la mezcla maestra de trabajo MMX,

- Cálculo del volumen de RXNMIX (mezcla de reacción):

Volumen de RXNMIX necesario = (número de muestras + 2 controles + 1) x 10 µl

RXNMIX 3 x 0,16 ml: Tampón tricina + Acetato de potasio + Hidróxido potásico + Glicerol + Tween 20 + EDTA + 5% de sulfóxido de dimetilo + < 0,09% de dNTP + < 0,10% de ADN polimerasa Z05 (microbiana) + < 0,10% de enzima AmpErase (uracilNglicosilasa) (microbiana) + < 0,003% de aptámero oligonucleótido + 0,08% de azida sódica

- Cálculo del volumen de BRAF OM (mezcla de oligonucleótidos BRAF):

Volumen de BRAF OM necesario = (número de muestras

+ 2 controles + 1) x 8 µl

BRAF OM 3 x 0,13 ml: Tampón Tris-HCl + EDTA + 0,09% de azida sódica + ARN poli Ar (sintético) + < 0,01% de cebadores ascendente y descendente BRAF + < 0,01% de sondas BRAF con marcador fluorescente

- Cálculo del volumen de MGAC (acetato de manganeso):

Volumen de MGAC necesario = (número de muestras + 2 controles + 1) x 7 µl

MGAC 3 x 0,15 ml: Acetato de magnesio + 0,09% de azida sódica

Obtenemos los viales necesarios de RXNMIX , BRAF OM y MGAC de la nevera a 2-8 °C. Agitamos cada reactivo durante 5 segundos para que se deposite el líquido en la parte inferior del tubo antes de utilizarlo,

- Etiquetamos un tubo para microcentrífuga estéril para la mezcla maestra de trabajo (MMX).
- Añadimos el volumen calculado de RXNMIX al tubo marcado para la solución MMX.
- Añadimos el volumen calculado de BRAF OM al tubo marcado para la solución MMX.
- Añadimos el volumen calculado de MGAC al tubo marcado para la solución MMX.
- Agitamos el tubo durante 5 segundos para asegurar una buena mezcla.
- Utilizamos placas de PCR (placa de amplificación y detección) y plásticos de sellado para el sistema cobas® 4800.

- Añadimos 25 µl de solución MMX de trabajo en cada pocillo de reacción de la placa de PCR (placa de amplificación y detección) necesario para la serie.

Adición de controles y muestras:

- Añadimos 25 µl de control BRAF MUT (control de BRAF mutado). BRAF MUT 2 x 0,13 ml: Tampón Tris-HCl + EDTA + ARN poli Ar (sintético) + 0,05% de azida sódica + < 0,001% de ADN plasmídico (microbiano) con secuencia BRAF mutada + < 0,001% de ADN plasmídico (microbiano). Utilizamos una pipeta para mezclar bien y aspirar y dispensamos la mezcla en el pocillo un mínimo de dos veces.
- Añadimos 25 µl de control BRAF WT (control de BRAF no mutado). BRAF WT 2 x 0,13 ml: Tampón Tris-HCl + EDTA + ARN poli Ar (sintético) + 0,05% de azida sódica + < 0,001% de ADN plasmídico (microbiano) con secuencia BRAF no mutado. Utilizamos una pipeta para mezclar bien y luego aspirar y dispensar la mezcla en el pocillo un mínimo de dos veces.
- Con una pipeta equipada con una punta resistente a aerosoles, añadimos 25 µl de ADN de muestra diluido en el pocillo correspondiente que contenga MMX de trabajo, empezando por la posición C01 de la placa de PCR (placa de amplificación y detección).
- Mezclamos la reacción con ayuda de la pipeta para aspirar y dispensar la mezcla en cada pocillo un mínimo de dos veces.
-

- Tapamos la placa de PCR (placa de amplificación y detección) con el plástico de sellado (suministrado con las placas).
- Utilizamos un sellador para asegurar que el plástico se adhiere bien a la placa de PCR
- Comprobamos que todo el líquido se deposite en la parte inferior de cada pocillo antes de iniciar la amplificación y detección.

Para la amplificación:

- Se calienta la mezcla de reacción de PCR para desnaturalizar el ADN genómico. Los cebadores hibridan las secuencias de ADN diana cuando la mezcla se enfría.
- El Z05 ADN polimerasa, en presencia de iones de metal divalente y dNTP en exceso, prolonga cada cebador hibridado, por lo que se produce la síntesis de una segunda cadena de ADN.
- Se completa el primer ciclo de la PCR, produciendo una copia de doble cadena de ADN de la región de 116 pares de bases-dirigida del gen BRAF.
- Este proceso se repite un número de ciclos, con cada ciclo doblando la cantidad de ADN del amplicón. La amplificación se produce sólo en la región del gen BRAF entre los cebadores.
-

3.6.1.2. Detección automatizada en tiempo real

- Cada sonda de oligonucleótido de la reacción posee un marcador fluorescente que actúa como emisor (*reporter*) y un enmascarador/silenciador (*quencher*) que silencia las emisiones de fluorescencia del marcador de las sondas intactas.
- Durante cada ciclo de amplificación, la sonda complementaria a la secuencia de ADN de una sola cadena en la amplificación se une y posteriormente se escinde por la actividad nucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa Z05.
- Una vez que el marcador emisor se separa del silenciador por la actividad de la nucleasa, es posible medir la fluorescencia de una longitud de onda característica cuando el colorante indicador es excitado por el espectro de luz apropiada.
- Se utilizan dos colorantes diferentes para etiquetar los de tipo silvestre BRAF específica de la diana y la sonda de mutación BRAF^{V600E}.
- La amplificación de las dos secuencias de BRAF se puede detectar de forma independiente en un único pocillo de reacción mediante la medición de fluorescencia a las dos longitudes de onda características.

3.6.1.3. Amplificación selectiva

La amplificación selectiva de los ácidos nucleicos diana de la muestra se logra mediante la enzima AmpErase (uracilo-N-glicosilasa) y el trifosfato de desoxiuridina (dUTP). La enzima de AmpErase reconoce y cataliza la destrucción de las cadenas de ADN que contienen desoxiuridina, pero no de ADN que contiene timidina. La desoxiuridina no está presente en el ADN de origen natural, pero siempre está presente en el amplicón, debido a la utilización de dUTP como uno de los trifosfatos de nucleótidos en el reactivo de la mezcla de reacción. Sólo el amplicón contiene desoxiuridina. La desoxiuridina hace que el amplicón sea susceptible a la destrucción

por la enzima de AmpErase. La enzima de AmpErase se incluye en el reactivo mezcla de reacción que cataliza la escisión de ADN que contiene desoxiuridina en los residuos de desoxiuridina mediante la apertura de la cadena de desoxirribosa en la posición C1. Cuando se calienta en la primera etapa de ciclado térmico a pH alcalino, el amplicón se rompe en la posición de la desoxiuridina, haciendo así que la cadena de ADN no sea amplificable. La enzima de AmpErase es inactiva a temperaturas por encima de 55°C, es decir, a través de los pasos de ciclos térmicos, y por lo tanto no destruye el ADN del amplicón diana.

3.6.1.4. Informe de resultados de cobas®

Los resultados fueron generados automáticamente en un informe mediante *Cobas BRAF Analysis Software Package* (Fig. 11). El tiempo total de la prueba que incluye el aislamiento de ADN es de aproximadamente 8 horas. Los resultados se informaron como:

- La mutación V600 detectada
- La mutación V600 no se detecta
- No valorable

Esta prueba muestra reactividad cruzada limitada con especímenes mutados no V600E (V600K, V600D y V600E2). La distribución de las mutaciones del codón 600 se establece (variaciones según el estudio consultado): V600E (GAG) 81,7%, V600K (AAG) 12,4%, V600R (AGG) 3,1%, V600E2 (GAA) 2,2%, V600D (GAC) 0,3% y V600M (ATG) 0,3%. Esta técnica es capaz de detectar un 70% de V600K.



Figura 11. Equipo cobas z480 y Test cobas 4800 V600 (Roche Molecular)

3.6.2. Proceso de detección de la mutación $BRAF^{V600E}$ mediante el anticuerpo monoclonal de ratón VE1

Para este estudio se hicieron cortes de 4 μm de espesor de los bloques de parafina de tejido tumoral. De todos ellos se realizó estudio inmunohistoquímico. El protocolo seguido para la técnica de IHQ fue el procedimiento de tinción Ventana realizado bajo incubación en cámara de aceite mineral y a temperatura controlada en un equipo BenchMark GX (Fig. 12). El anticuerpo primario utilizado fue el BRAF (VE1) monoclonal de ratón y se realizó el proceso según protocolo indicado por el fabricante.

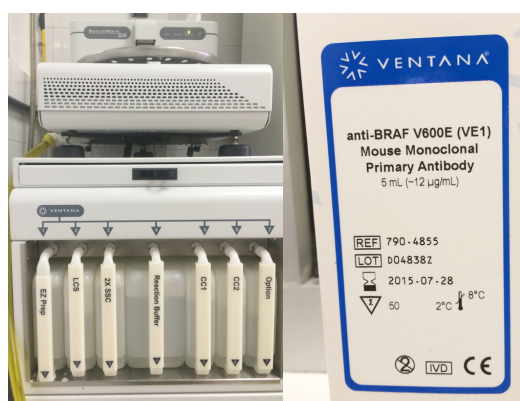


Figura 12. Equipo Ventana BenchMark GX (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ)

De forma esquemática, a continuación se comentan los pasos que se siguieron:

1. Desparafrinado de los cristales.
2. Desenmascaramiento: 64' de incubación con CC1.
3. Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena:
 - Incubar con la solución bloqueante (*Inhibitor CM Ventana*) durante 10 minutos a 37°C.
 - Lavar con TBS (*Ventana*) durante 10 minutos.
4. Incubación con el anticuerpo primario (anti-VE1):
 - Se incubó durante 30 minutos a 37°C.
 - Lavar con solución de lavado TBS (*Tris-buffered saline*) de Ventana.
5. Añadir multímero específico conjugado con peroxidasa (Optiview Linker-8'/Optiview HRP Multimer-8'):
 - Incubar durante 15 minutos a 37°C.
 - Lavar con solución de lavado TBS de Ventana.
6. Añadir la solución de sustrato-cromógeno DAB-CM de Ventana en presencia de sales de cobre (Cooper CM de Ventana):
 - Incubar 5 minutos a 37°C.
 - Lavar con TBS de Ventana.
7. Contrateñir con una gota de hematoxilina acuosa (Ventana):
 - Incubar 4 minutos.
 - Lavar con agua destilada.
8. Postcontra-tinción. Aplicar una gota de Bluing y Reagent 4'.
9. Deshidratación de las preparaciones con alcoholes crecientes (70°, 96°, 100°), y xilol.
10. Montar con DPX.

3.6.3. Secuenciación directa Sanger de los casos discordantes

En los 10 casos discordantes, se realizó secuenciación directa para detectar las mutaciones en el exón 15 del gen *BRAF*. El ADN genómico se extrajo a partir de

secciones de parafina mediante un Kit QIAamp DNA FFPE (Qiagen, Hilden, GER) siguiendo los protocolos del fabricante. La calidad y cantidad de ADN aislado se analizó mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific, Wilmington, EE.UU.). Se utilizó un total de 50-100 ng de ADN genómico para la amplificación por PCR del gen *BRAF* en el exón 15 mediante el uso de secuencias de los cebadores (Lovly CM y cols., 2012)¹⁴⁸ con una temperatura de hibridación de 55°C. Los productos de PCR se purificaron con el Kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) para la detección de mutaciones de *BRAF*^{V600} mediante secuenciación de Sanger. En pocas palabras, se llevó a cabo la reacción de secuenciación mediante el Ciclo de Secuenciación Kit v3.1 BigDye® Terminator (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.) siguiendo las instrucciones. El Kit de purificación de BigDye XTerminator® (Life Technologies) se utilizó para la purificación de las reacciones de secuenciación de ADN eliminación de terminadores y sales BigDye® no incorporadas. Análisis de secuenciación se llevaron a cabo en el 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies) (Fig. 13).

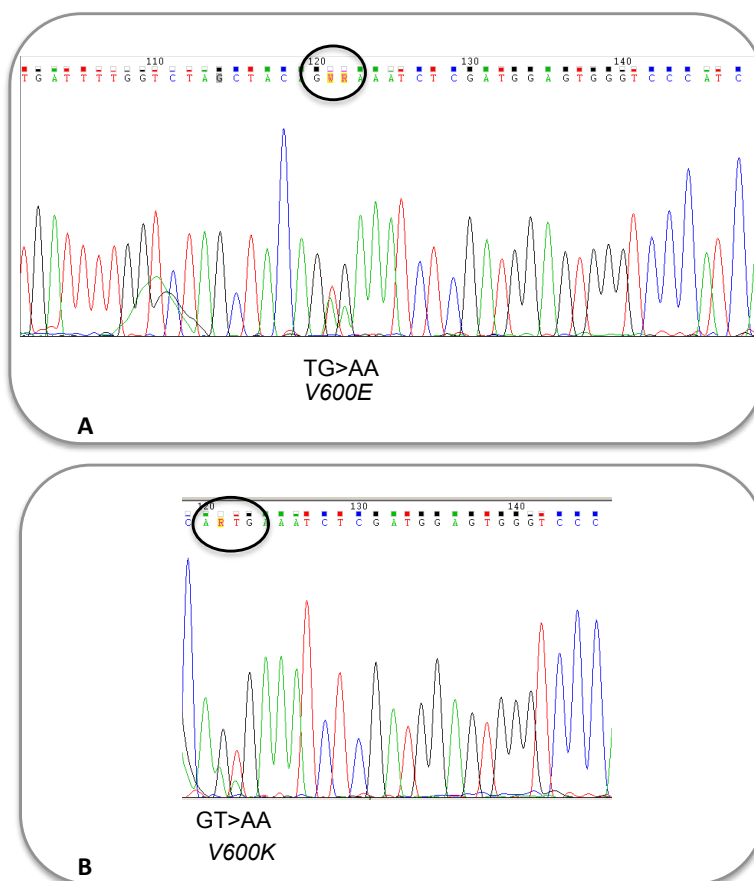


Figura 13. Electroferogramas representativos del análisis de la secuencia directa de la mutación BRAF (exón 15). A: BRAF^{V600E}; B: BRAF^{V600K}

3.7. Valoración de las muestras y análisis de heterogeneidad intratumoral mediante IHQ

Los resultados obtenidos mediante *Cobas® 4800 BRAF Mutation Test* (mutado, no mutado, no valorable) fueron recogidos en una tabla de datos. De forma paralela, cada uno de los resultados de la IHQ fueron evaluados en el microscopio óptico por un patólogo y un dermatólogo. Así, los resultados fueron clasificados para establecer categorías de la expresión del anticuerpo (Fig. 14):

1. Presencia de mutación:
 - Positivo: las células tumorales mostraban tinción citoplasmática clara.
 - Negativo: las células tumorales no presentaban tinción o sólo tinción de forma aislada, en menos del 10 %.

2. Distribución de la tinción:

- Homogénea: captación completa de toda la superficie tumoral.
- Heterogénea: tinción de subclones y áreas de tumor sin tinción.

3. No valorable: cuando el tumor no se pudo identificar en la sección, por muestra insuficiente, o por estar agotada tras las técnicas previas.

Sobre estos criterios, se evaluaron todas las secciones correspondientes a cada tipo tumoral, sin tener conocimiento de ningún dato clínico y se recogieron en la misma tabla (Tabla 10).

<i>Presencia de mutación</i>	<i>Distribución</i>	<i>No valorables</i>
Positiva/negativa	Homogénea/Heterogénea	

Tabla 10. Categorías de expresión de la inmunotinción del anticuerpo monoclonal primario de ratón VE1 en las preparaciones

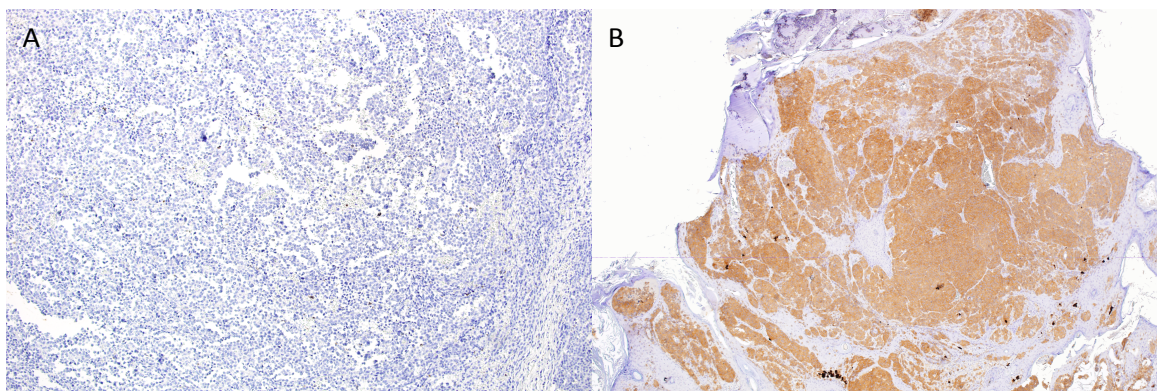


Figura 14. Casos representativos de la expresión del anticuerpo monoclonal de ratón anti-VE1. A: negativo. B: positivo-intenso-homogéneo

3.8. Estudio estadístico de los datos obtenidos

3.8.1. Variables a estudio

3.8.1.1. Variables clínicas

Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes y se recogieron los siguientes datos clínicos relevantes para nuestro estudio:

- Identificación del paciente.
- Fecha de nacimiento.
- Sexo (varón/mujer).
- Fecha de diagnóstico del melanoma primario.
- Número de biopsia de las muestras tumorales.
- Tipo de melanoma primario (MES, MN, LMM y MLA).
- Localización del tumor primario (cabeza y cuello, tronco, extremidades y acrales).
- Tipo de metástasis (piel, ganglio y visceral).
- Fecha diagnóstico de metástasis.
- Localización de las metástasis (en tránsito, ganglionares y a distancia).

3.8.1.2. Variables histopatológicas

Se revisaron todos los casos seleccionados y se valoraron los siguientes datos anatomopatológicos:

- Diagnóstico del tipo histológico de melanoma primario: MES, MN, LMM y MLA.
- Índice de Breslow del melanoma primario, calculado en milímetros y categorizado según la clasificación TNM (T1 < 1,00 mm, T: 1,01-2,00 mm, T3: 2,01 mm -4,00 mm y T4 >4 mm).
- Nivel de Clark en melanoma primario (I: tumor confinado a la epidermis, II: infiltra parcialmente la dermis papilar, III: el tumor ocupa toda la dermis papilar, IV: el tumor infiltra la dermis reticular y V: el tumor llega hasta el tejido celular subcutáneo).
- Infiltrado inflamatorio linfocitario en melanoma primario: ausente o presente. Se consideró la intensidad (ligera o intensa) y su distribución (en el frente de avance o dentro del tumor).

- Ulceración en melanoma primario: ausente o presente.

3.8.1.3. Variables biológicas:

Cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test

- WT (tipo silvestre)
- Mutado
- No valorable

IHQ

- BRAF^{V600E} positivo
- BRAF^{V600E} negativo
- No valorable

Secuenciación directa(Sanger)

- BRAF^{V600E}
- BRAF^{V600K}
- WT
- No valorable

3.8.2. Tratamiento estadístico:

Los datos recogidos de todas las variables clínicas se incluyeron en una base de datos construida sobre la aplicación informática Microsoft EXCEL, al igual que los datos histopatológicos y moleculares. El estudio estadístico se realizó utilizando el paquete informático SPSS v13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL), considerando todos los cálculos hasta el nivel de significancia de 0,05.

3.8.2.1. Estadística descriptiva

Se realizó la descripción de la muestra a través de las diferentes variables, mediante tablas y gráficas de frecuencias y porcentajes.

3.8.2.2. Estadística analítica

Teniendo en cuenta los objetivos descritos en la sección “Objetivos” (2.2), se procede a realizar un análisis estadístico para contrastar algunas de las hipótesis planteadas. Cabe destacar que para este estudio se han escogido 62 pacientes con melanomas metastásicos en diferentes estadios. De los 62 pacientes, en 40 se han estudiado una metástasis y en 22 hemos estudiado dos metástasis, por lo que el número de melanomas primarios cutáneos es 62 y el número de metástasis es 84 sumando un total de 146 muestras entre melanomas primarios y metastástasis.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo es evaluar la heterogeneidad intertumoral entre los melanomas primarios y sus metástasis. Para estudiar dicha heterogeneidad, en primer lugar, se procede en la sección “Heterogeneidad intertumoral entre melanoma primario y sus metástasis mediante qPCR de forma pareada (*Cobas BRAFV600 Mutation Test*)” (4.2), a la comparación descriptiva entre el porcentaje de melanomas primarios y sus metastásis con el gen mutado que han sido detectados mediante la técnica diagnóstica qPCR. De manera pareada y a nivel descriptivo se analiza también el porcentaje de individuos que mantienen dicho gen mutado en el melanoma primario y en las metástasis de cada paciente. Posteriormente, en la sección “Homogeneidad intertumoral entre melanoma primario y sus metástasis de forma pareada mediante IHQ” (4.3), se presenta un estudio similar para evaluar la heterogeneidad intertumoral pero ahora utilizando el método diagnóstico IHQ, se observa que el 100% de los tumores metastásicos procedentes de un tumor primario conservan dicha mutación. Para poder describir las discordancias entre ambos métodos diagnósticos en la sección “Concordancia entre dos métodos: Cobas® e IHQ. Prueba *gold estándar*: Secuenciación directa (Sanger)” (4.4), se analizan y describen los casos discordantes entre ambos métodos (IHQ y qPCR), mostrando también los resultados de la prueba de secuenciación directa que permite detectar otras mutaciones *BRAF*^{V600}. El análisis descrito en las secciones 4.2-4.4, presenta en sí mismo un algoritmo diagnóstico para evaluar la homogeneidad intertumoral entre los melanomas primarios y sus metastásis.

Para analizar la eficacia de la prueba diagnóstica presentada en este proyecto, se analiza la homogeneidad de la mutación de *BRAF* entre tumores primarios y metastásicos. Esta homogeneidad se analiza mediante el test de Fisher asumiendo independencia entre melanomas. Este test, permite detectar si a la vista de los datos se puede concluir si existen diferencias significativas entre el porcentaje poblacional de melanomas primarios con la mutación de *BRAF* y el porcentaje poblacional de melanomas metastásicos con dicha mutación. Para evaluar la eficacia de la prueba diagnóstica presentada en estos casos, se estima la probabilidad condicionada (mediante un intervalo de confianza) de detectar el gen mutado *BRAF* con este algoritmo diagnóstico en el melanoma metastásico, bajo la hipótesis de que el melanoma primario también presentaba dicho gen mutado. De manera análoga se estima la probabilidad condicionada (mediante un intervalo de confianza) de que no se detecte el gen mutado *BRAF* en el melanoma metastásico cuando el melanoma primario tampoco la presentaba. Finalmente, se estima la probabilidad de concordancia entre el melanoma primario y metastásico.

Otro de los objetivos que se planteaban en esta memoria, era estudiar las relaciones entre el estado mutacional de *BRAF*^{V600} (positivo o negativo) con las características clínicopatológicas de los melanomas primarios cutáneos y las características de los pacientes. Para estudiar las relaciones entre las variables edad, índice de Breslow, y el estado mutacional se ha realizado un contraste de igualdad de medianas de la variable de naturaleza continua y las poblaciones generadas por los individuos con mutación positiva y negativa.

Por otro lado, para estudiar las relaciones entre las variables sexo, localización del melanoma primario, subtipo de melanoma, nivel de Clark, ulceración, inflamación (de naturaleza nominal) y la variable estado mutacional de *BRAF*^{V600} se ha realizado un test de homogeneidad de Fisher.

En la sección “Asociaciones clínicopatológicas de la presencia de la mutación de $BRAF^{V600}$ ” (4.7) pueden verse estos análisis.

Ahondando un poco más en estos estudios correlacionales, se ha realizado estudios similares a los anteriores pero desagregando la variable estado de mutación que presentaba únicamente dos valores (positivo o negativo) en tres niveles (negativo, V600E, V600K).

Para esta nueva variable de 3 niveles en el estado de mutación, se analizan las relaciones y correlaciones con las variables edad, índice de Breslow, mediante un diseño de experimentos (ANOVA) para detectar el impacto que tiene el estado de mutación en dichas variables (ver sección: “Asociaciones clínicopatológicas de la forma de la mutación $BRAF^{V600K}$ ” -4.7.3)

Por otro lado, mediante un test de Fisher se estudian las relaciones o independencia entre la nueva variable estado de mutación y otras variables de naturaleza nominal como son sexo, tipo de melanoma, ulceración.

Se valoró el grado de acuerdo de la inmunohistoquímica con el anticuerpo VE1 frente qPCR, sección: “Grado de acuerdo de qPCR frente IHQ” (4.8), a través del cálculo de la sensibilidad y especificidad, los valores predictivos positivo y negativo y el coeficiente kappa.

La influencia de las diferentes variables como factores pronósticos independientes en la supervivencia, se analizó mediante el método de Log Rank. La supervivencia global se definió como el tiempo a la muerte por la enfermedad o por cualquier causa. La supervivencia libre de enfermedad se calculó como el tiempo hasta la recaída de la enfermedad, local, regional o a distancia, o la muerte por cualquier causa (secciones 4.9-4.12).

La supervivencia se analizó mediante el método de Kaplan-Meier o de estimación de producto límite. Este método utiliza el concepto de probabilidad condicionada,

calculando la probabilidad de que, habiendo llegado vivo al final del intervalo "K", sobreviva "K+1". El producto de estas probabilidades condicionadas sucesivas de cada intervalo, proporciona las tasas acumuladas de supervivencia desde el comienzo del estudio hasta el final de cada uno de ellos. Se consideran "casos censurados", aquellos en los que no se ha producido la muerte o en los que no se ha completado el seguimiento a tiempo completo. La supervivencia fue analizada en función de las distintas variables expuestas. Los resultados se expresaron en porcentajes de supervivencia acumulada a los años, desde la fecha de diagnóstico. Se obtuvieron tablas de supervivencia, el tiempo medio de supervivencia en meses o en años, así como las curvas de supervivencia (función de supervivencia acumulada).

4

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análisis descriptivo. Características clínicas e histopatológicas de la muestra (Tabla 11)

4.1.1. Edad y sexo

En nuestra serie de 62 pacientes del Hospital Universitario 12 de Octubre, estudiamos el estado de la mutación de $BRAF^{V600}$ de las muestras de melanoma primario y metástasis de forma pareada, según el modelo diagnóstico de la mutación de $BRAF^{V600E}$ de nuestro estudio.

La edad de diagnóstico de los pacientes de la muestra seleccionada, estaba comprendida entre 23 y 87 años, con una mediana de 59,00 años. Del total de pacientes, 28/62 (45,16%) correspondían a mujeres y 34/62 (54,84%) a varones (Fig. 15).

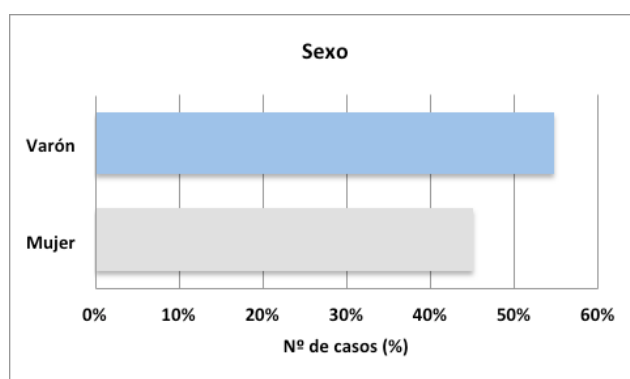


Figura 15. Distribución de la muestra por sexo en nuestra serie (porcentaje)

4.1.2. Distribución de la muestra: melanoma primario/metástasis

Nuestra muestra estaba compuesta por 146 tumores, de los cuales 62/146 (42,47%) eran melanomas primarios, y 84/146 (57,53%) sus metástasis (Fig. 16). Las metástasis se distribuían de la siguiente forma: 46/84 metástasis en piel (54,76%), 33/84 ganglionares (39,29%) y 5/84 viscerales (5,95%) (Fig. 17). En 22/62 (35,48%) pacientes recogimos más de un tipo de metástasis (piel, ganglio y visceral) y en 40/62 (64,52%) escogimos una metástasis (Fig. 18), esta selección estaba determinada por la

disponibilidad de tumores en el archivo del hospital. Además, clasificamos los melanomas según la localización de sus metástasis. Así, nos encontramos con que 28 (50,91%) tenían metástasis en tránsito, 41 (70,69%) metástasis ganglionares y 40 (71,43%) a distancia.

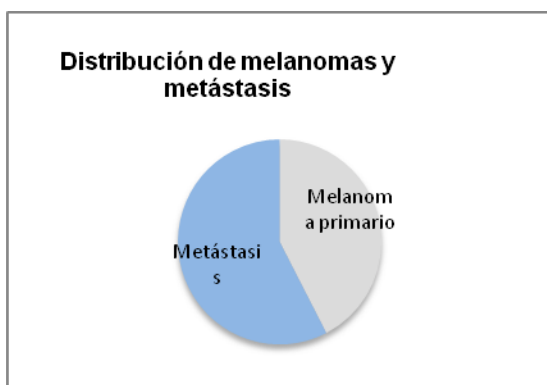


Figura 16. Distribución de melanoma primario y metástasis en nuestra serie (porcentaje)

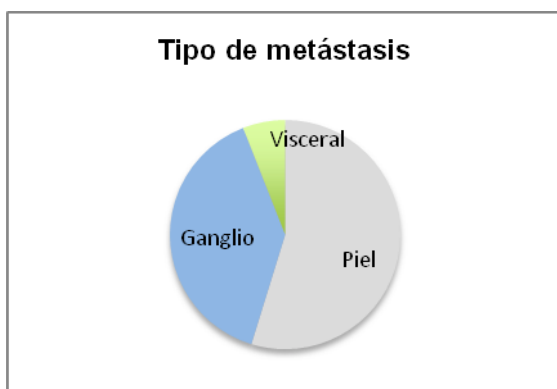


Figura 17. Distribución por tipo de metástasis en nuestra serie (porcentaje)

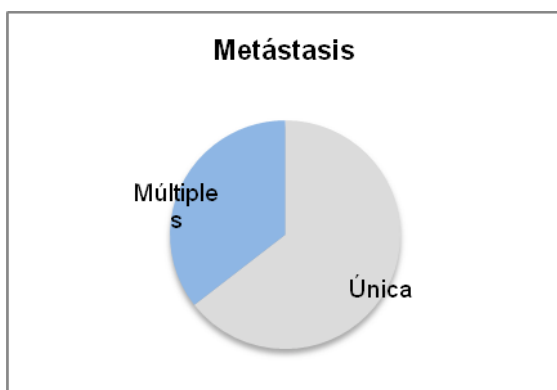


Figura 18. Distribución de melanomas con metástasis únicas y múltiples en nuestra serie (porcentaje)

4.1.3. Tipo histológico de melanoma

Dentro de los 62 melanomas primarios cutáneos agrupamos los casos según el subtipo histológico de melanoma. En el estudio sólo incluimos: MES, LMM, MN, MLA. El resultado final del tipo de melanoma más frecuente fue el MES 33/62 (53,23%). A continuación, el MLA 16/62 (25,81%), MN 9/62 (14,52%) y el menos prevalente fue el LMM 4/62 (6,45%) (Fig. 19).

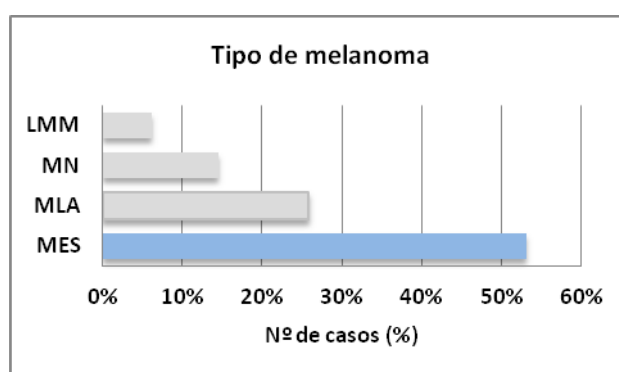


Figura 19. Tipo de melanoma en la muestra (porcentaje)

4.1.4. Localización del melanoma primario

Los casos de melanoma primario cutáneo se clasificaron según la localización del melanoma primario. De esta forma, se distribuyeron en cuatro grupos (cabeza y cuello, tronco, extremidades y manos/pies). La localización del melanoma primario más frecuente fue el tronco 23/62 (37,10%), seguida de los pies y manos (acral) 16/62 (25,81%), las extremidades 12/62 (19,35%) y la cabeza y cuello 11/62 (17,74%) (Fig. 20).

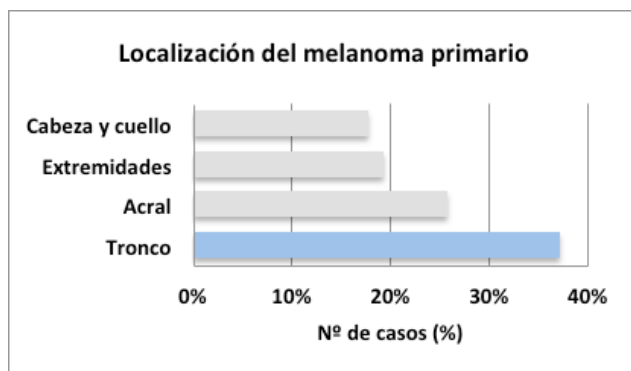


Figura 20. Distribución por localización del melanoma primario en nuestros casos (porcentaje)

4.1.5. Variables histopatológicas del melanoma primario (índice de Breslow, nivel de Clark, ulceración e inflamación)

La mediana del índice de Breslow de los melanomas primarios fue 3,19 (0,45-18,18) mm. El número de melanomas que presenta un nivel de Clark III fue 26/62 (41,94%); nivel de Clark IV: 27/62 (43,55%); y nivel de Clark V: 9/62 (14,52%).

Se observó ulceración en 31/62 (50%) de los melanomas (Fig. 21). Por último, de los 62 pacientes que describimos, 31 (50,82%) presentaban un infiltrado inflamatorio moderado o intenso (Fig. 21).

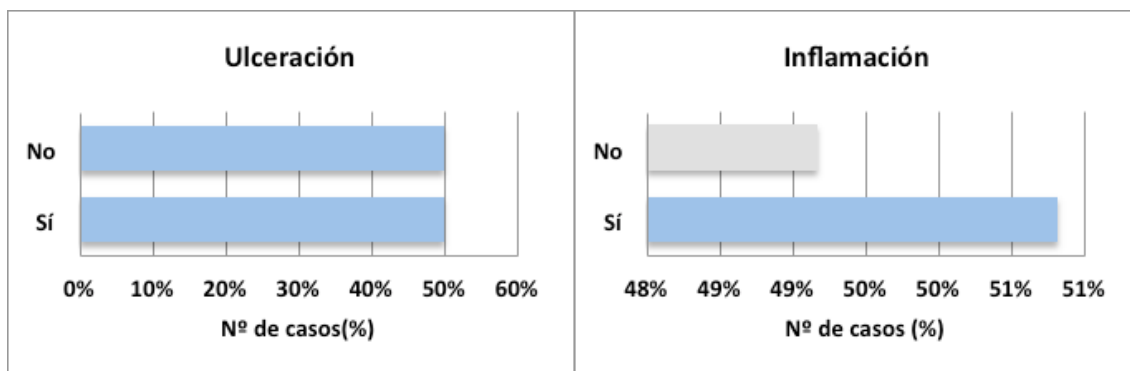


Figura 21. Ulceración e inflamación en el melanoma primario (porcentaje)

4.1.6. Evolución

Al analizar melanomas metastásicos, cuya mortalidad es muy elevada, realizamos seguimiento de los pacientes y registramos el número de *exitus*; y de los fallecidos, buscamos la causa de muerte (muerte por melanoma o por otras causas). De los 62 pacientes estudiados, fallecieron 35/62 (58,33%), y permanecían vivos 25/62 (41,67%) y en dos desconocemos su estado (Fig. 24). La causa de muerte en la mayoría de los pacientes fue por melanoma, en 34/35 (97,15%), y solamente en 1/35 (2,86%) por otro motivo (Fig. 22).

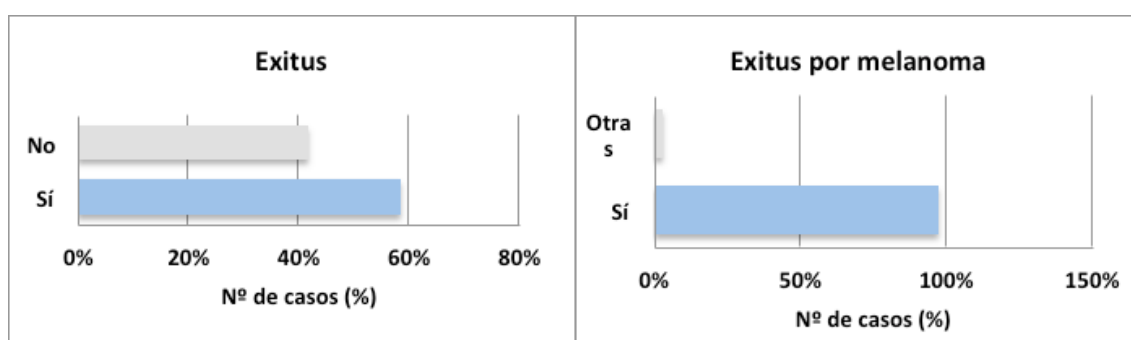


Figura 22. Exitus en nuestra muestra y muertes por melanoma (porcentaje)

TABLA: VARIABLES ESTUDIADAS	
Variables	Nº de casos (%)
Clínicas	
Edad (años) – mediana (rango)	59,00 (23-87) años
Sexo	
Mujer	28 (45,16%)
Varón	34 (54,84%)
Tipo de melanoma	
MES	33 (53,23%)
MLA	16 (25,81%)
MN	9 (14,52%)
LMM	4 (6,45%)
Localización melanoma primario	
Tronco	23 (37,10%)
Acral	16 (25,81%)
Extremidades	12 (19,35%)
Cabeza y cuello	11 (17,84%)
Metástasis	
Piel	46 (54,76%)
Ganglio	33 (39,29%)
Visceral	5 (5,95%)
Exitus	
Sí	35 (58,33%)
No	25 (41,67%)
Histopatológicas	
Índice de Breslow (mm)- mediana (rango)	3,19 (0,45-18,10) mm
Nivel de Clark	
III	26 (41,94%)
IV	27 (43,55%)
V	9 (14,52%)

Tabla 11. Variables clínicas e histológicas (nº casos/%) estudiadas en la muestra (n: 62)

4.2. Heterogeneidad intertumoral entre melanoma primario y sus metástasis mediante qRT-PCR de forma pareada (Cobas® BRAFV600 Mutation Test)

Analizamos un total de 146 tumores mediante Cobas® 4800 BRAFV600 Mutation Test. Se incluyeron 62 tumores primarios y 84 metastásicos. La mutación $BRAF^{V600}$ fue detectada en 32/62 (51,61%) de los melanomas primarios y en 48/84 (57,14%) de las metástasis. Al comparar, el estado de la mutación $BRAF^{V600}$ entre melanomas

primarios y sus metástasis correspondientes, 52 pacientes (83,87%) mantuvieron el estado de la mutación $BRAF^{V600}$ entre el primario y las metástasis (homogeneidad intertumoral). Por lo tanto, los resultados fueron consistentes en todos estos casos (Tabla 12 y 13). En el resto, 10 pacientes (16,12%) mostraron un patrón discordante entre el melanoma primario y sus metástasis (heterogeneidad intertumoral) (Tabla 14). Entre los 10 casos discordantes, 7 pacientes presentaban negatividad para la mutación en el melanoma primario y positividad en sus metástasis y tres positividad en el melanoma primario y negatividad en sus metástasis. Los tres pacientes que presentaban la mutación en $BRAF^{V600}$ en el melanoma primario y no mantenían los resultados en sus metástasis, eran dos ganglios y una metástasis visceral. De los 7 melanomas primarios negativos para la mutación y con 9 metástasis positivas, 3 fueron ganglionares y 6 metástasis cutáneas.

nº caso	MELANOMA 1º	PCR 1º	MI	PCR (MI)	MII	PCR (MII)
3	MES	WT	ganglio	WT	Ø	Ø
4	MLA	WT	piel	WT	Ø	Ø
5	MLA	WT	ganglio	WT	Ø	Ø
6	LMM	WT	piel	WT	Ø	Ø
7	MLA	WT	piel	WT	Ø	Ø
8	MES	WT	piel	WT	Ø	Ø
16	MLA	WT	piel	WT	Ø	Ø
17	MLA	WT	ganglio	WT	Ø	Ø
19	MES	WT	piel	WT	Ø	Ø
20	MLA	WT	ganglio	WT	Ø	Ø
24	MES	WT	piel	WT	Ø	Ø
25	MN	WT	piel	WT	Ø	Ø
31	MLA	WT	ganglio	WT	Ø	Ø
32	LMM	WT	ganglio	WT	Ø	Ø
33	LMM	WT	piel	WT	Ø	Ø
35	MES	WT	ganglio	WT	Ø	Ø
52	MLA	WT	ganglio	WT	piel	WT
54	MN	WT	piel	WT	ganglio	WT
55	MES	WT	ganglio	WT	piel	WT
57	MES	WT	piel	WT	ganglio	WT
58	MLA	WT	piel	WT	ganglio	WT
61	MLA	WT	piel	WT	ganglio	WT
62	MES	WT	ganglio	WT	piel	WT

Tabla 12. Resultados Cobas® BRAFV600 Mutation Test concordantes wild type (n: 23). WT: wild type (silvestre)

nº caso	MELANOMA 1º	PCR 1º	MI	PCR (MI)	MII	PCR (MII)
2	MES	mutado	visceral	mutado	Ø	Ø
9	MN	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
10	MES	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
11	MES	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
12	MES	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
13	MES	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
14	MES	mutado	ganglio	mutado	Ø	Ø
15	MES	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
21	MES	mutado	ganglio	mutado	Ø	Ø
22	MN	mutado	visceral	mutado	Ø	Ø
23	MLA	mutado	ganglio	mutado	Ø	Ø
26	MLA	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
28	MES	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
29	MES	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
34	MLA	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
36	MES	mutado	ganglio	mutado	Ø	Ø
37	MES	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
38	MLA	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
39	MLA	mutado	piel	mutado	Ø	Ø
44	MES	mutado	ganglio	mutado	piel	mutado
45	MES	mutado	piel	mutado	ganglio	mutado
46	MN	mutado	ganglio	mutado	piel	mutado
47	MN	mutado	ganglio	mutado	piel	mutado
49	MES	mutado	piel	mutado	ganglio	mutado
51	MES	mutado	ganglio	mutado	piel	mutado
53	MES	mutado	ganglio	mutado	piel	mutado
56	MN	mutado	piel	mutado	ganglio	mutado
59	MN	mutado	piel	mutado	visceral	mutado
60	MES	mutado	piel	mutado	ganglio	mutado

Tabla 13. Resultados de RT-PCR concordantes *mutados* (n: 29). MI: metástasis uno; MII: segunda metástasis; Ø: ausencia de metástasis

nº caso	MELANOMA 1º	PCR 1º	MI	PCR (MI)	MII	PCR (MII)
1	MES	mutado	ganglio	WT	Ø	Ø
18	MES	mutado	ganglio	WT	Ø	Ø
27	MES	WT	piel	mutado	Ø	Ø
30	MES	mutado	visceral	WT	Ø	Ø
40	LMM	WT	piel	mutado	Ø	Ø
41	MES	WT	piel	mutado	ganglio	WT
42	MES	WT	piel	mutado	ganglio	mutado
43	MES	WT	piel	mutado	visceral	WT
48	MN	WT	piel	mutado	ganglio	mutado
50	MLA	WT	ganglio	mutado	piel	WT

Tabla 14. Casos discordantes mediante Cobas BRAF Mutation Test (n: 10)

4.3. Homogeneidad intertumoral entre melanoma primario y sus metástasis de forma pareada mediante IHQ.

Todos los casos (n=146) analizados mediante *Cobas® BRAFV600 Mutation Test*, a su vez, fueron estudiados a través de otro método, la IHQ anti-BRAF^{V600E} (VE1). Todos los resultados entre melanoma primario y sus metástasis eran concordantes. Por lo tanto, los 62 casos presentaron homogeneidad intertumoral de la expresión de BRAF^{V600E} mediante IHQ (100%) (Tabla 15 y 16). Los casos no valorables (NV) con IHQ, fueron aquellos que presentaban abundante necrosis en el corte estudiado o artefactos debidos a la técnica (n:=6; 4,1%).

nº caso	PCR 1º	IHQ 1º	MI	PCR (MI)	IHQ (MI)	MII	PCR (MII)	IHQ (MII)
3	WT	-	ganglio	WT	-	Ø	Ø	Ø
4	WT	-	piel	WT	-	Ø	Ø	Ø
5	WT	-	ganglio	WT	-	Ø	Ø	Ø
6	WT	-	piel	WT	NV	Ø	Ø	Ø
7	WT	-	piel	WT	-	Ø	Ø	Ø
8	WT	-	piel	WT	-	Ø	Ø	Ø
16	WT	-	piel	WT	-	Ø	Ø	Ø
17	WT	-	ganglio	WT	-	Ø	Ø	Ø
19	WT	-	piel	WT	-	Ø	Ø	Ø
20	WT	-	ganglio	WT	-	Ø	Ø	Ø
24	WT	-	piel	WT	-	Ø	Ø	Ø
25	WT	-	piel	WT	-	Ø	Ø	Ø
30	mutado	-	visceral	WT	-	Ø	Ø	Ø
31	WT	-	ganglio	WT	-	Ø	Ø	Ø
32	WT	-	ganglio	WT	-	Ø	Ø	Ø
33	WT	-	piel	WT	-	Ø	Ø	Ø
35	WT	-	ganglio	WT	-	Ø	Ø	Ø
40	WT	-	piel	mutado	-	Ø	Ø	Ø
42	WT	-	piel	mutado	-	ganglio	mutado	-
48	WT	-	piel	mutado	-	ganglio	mutado	-
50	WT	-	ganglio	mutado	-	piel	WT	-
52	WT	-	ganglio	WT	-	piel	WT	-
54	WT	-	piel	WT	-	ganglio	WT	-
55	WT	-	ganglio	WT	-	piel	WT	-
57	WT	-	piel	WT	-	ganglio	WT	-
58	WT	-	piel	WT	-	ganglio	WT	-
61	WT	-	piel	WT	-	ganglio	WT	-

Tabla 15. Resultados negativos IHQ (n: 27). -: positiva; NV: no valorable

nº caso	PCR 1º	IHQ 1º	MI	PCR (MI)	IHQ (MI)	MII	PCR (MII)	IHQ (MII)
1	mutado	+	ganglio	WT	+	Ø	Ø	Ø
2	mutado	+	visceral	mutado	+	Ø	Ø	Ø
9	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
10	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
11	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
12	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
13	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
14	mutado	+	ganglio	mutado	+	Ø	Ø	Ø
15	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
18	mutado	+	ganglio	WT	+	Ø	Ø	Ø
21	mutado	+	ganglio	mutado	+	Ø	Ø	Ø
22	mutado	+	visceral	mutado	+	Ø	Ø	Ø
23	mutado	+	ganglio	mutado	+	Ø	Ø	Ø
26	mutado	+	piel	mutado	NV	Ø	Ø	Ø
27	WT	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
28	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
29	mutado	NV	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
34	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
36	mutado	+	ganglio	mutado	+	Ø	Ø	Ø
37	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
38	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
39	mutado	+	piel	mutado	+	Ø	Ø	Ø
41	WT	+	piel	mutado	NV	ganglio	WT	+
43	mutado	+	piel	mutado	+	visceral	WT	+
44	mutado	+	ganglio	mutado	+	piel	mutado	+
45	mutado	+	piel	mutado	+	ganglio	mutado	+
46	mutado	+	ganglio	mutado	NV	piel	mutado	+
47	mutado	NV	ganglio	mutado	+	piel	mutado	+
49	mutado	+	piel	mutado	+	ganglio	mutado	+
51	mutado	+	ganglio	mutado	+	piel	mutado	+
53	mutado	+	ganglio	mutado	+	piel	mutado	+
56	mutado	+	piel	mutado	+	ganglio	mutado	+
59	mutado	+	piel	mutado	+	visceral	mutado	+
60	mutado	+	piel	mutado	+	ganglio	mutado	+
62	WT	+	ganglio	WT	+	piel	WT	+

Tabla 16. Resultados positivos IHQ (n: 35). +: positiva; NV: no valorable

4.4. Estudio de casos discordantes entre dos métodos: Cobas® e IHQ; prueba *gold standar*: Secuenciación directa (Sanger®)

Los casos discordantes entre qPCR e IHQ fueron sometidos a secuenciación directa (Sanger®) del gen *BRAF* para el exón 15 (Fig. 23), con el fin de dilucidar si la discordancia había sido motivada por la existencia de alguna otra mutación detectable mediante qPCR no por IHQ, que solo detecta V600E/V600E2. Tres de los casos negativos por IHQ presentaron la mutación *BRAF*^{V600K}, no detectable por inmunohistoquímica. De las 146 muestras, 7 son V600K (5,29%). Todos estos casos

fueron negativos por IHQ (Fig. 24: A y B), mientras que qPCR detectó 4 de los 7, un melanoma primario (nº: 30) y tres metástasis (nº: 40, 42) (Tabla 17).

nº caso	PCR 1º	IHQ 1º	S* 1º	PCR (MI)	IHQ (MI)	S* (MI)	PCR (MII)	IHQ(MII)	S* (MII)
1	mutado	+	V600E	WT	+	V600E	Ø	Ø	Ø
18	mutado	+	V600E	WT	+	WT	Ø	Ø	Ø
27	WT	+	V600E	mutado	+	V600E	Ø	Ø	Ø
30	mutado	-	V600K	WT	-	V600K	Ø	Ø	Ø
40	WT	-	V600K	mutado	-	V600K	Ø	Ø	Ø
41	WT	+	V600E	mutado	NV	V600E	WT	+	V600E
42	WT	-	V600K	mutado	-	V600K	mutado	-	V600K
43	WT	+	V600E	mutado	+	V600E	WT	+	V600E
48	WT	-	WT	mutado	-	WT	mutado	-	WT
50	WT	-	WT	mutado	-	WT	WT	-	WT

Tabla 17. Concordancia entre RT-PCR e IHQ. Secuenciación directa

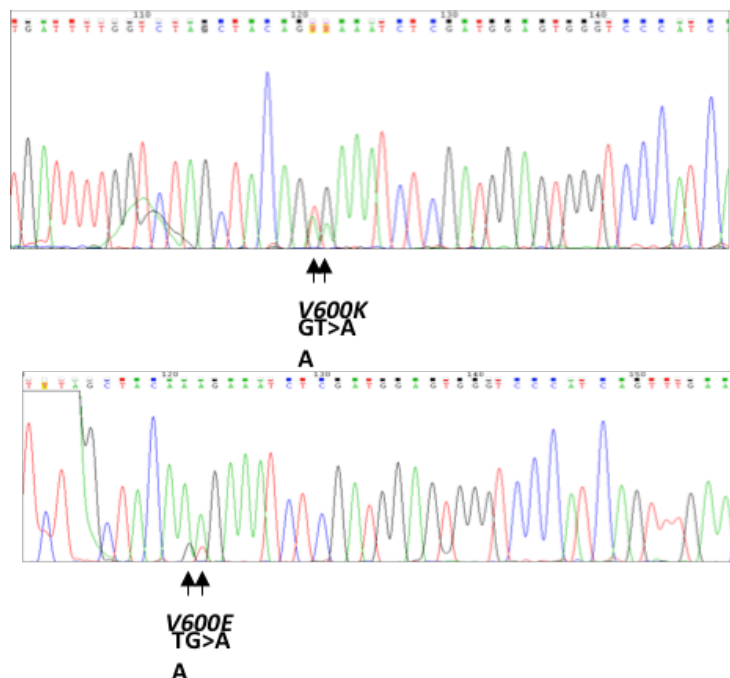


Figura 23. Resultados representativos de secuenciación directa (Sanger®) positivos para las mutaciones V600E y V600K

Fig 24. A: Casos discordantes de metástasis única. Panel representativo de imágenes microfotográficas de los pacientes con casos discordantes mediante H-E e IHQ

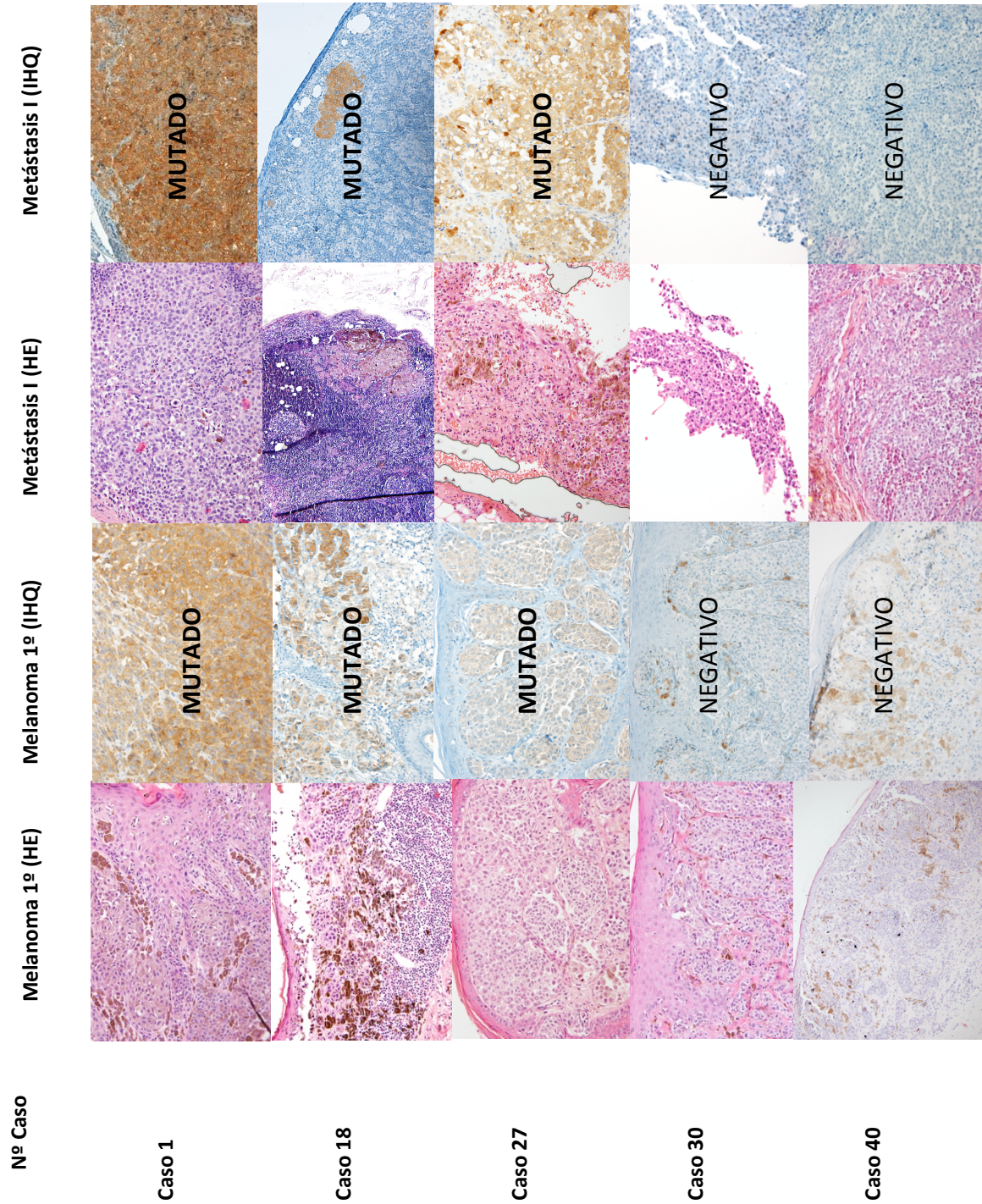
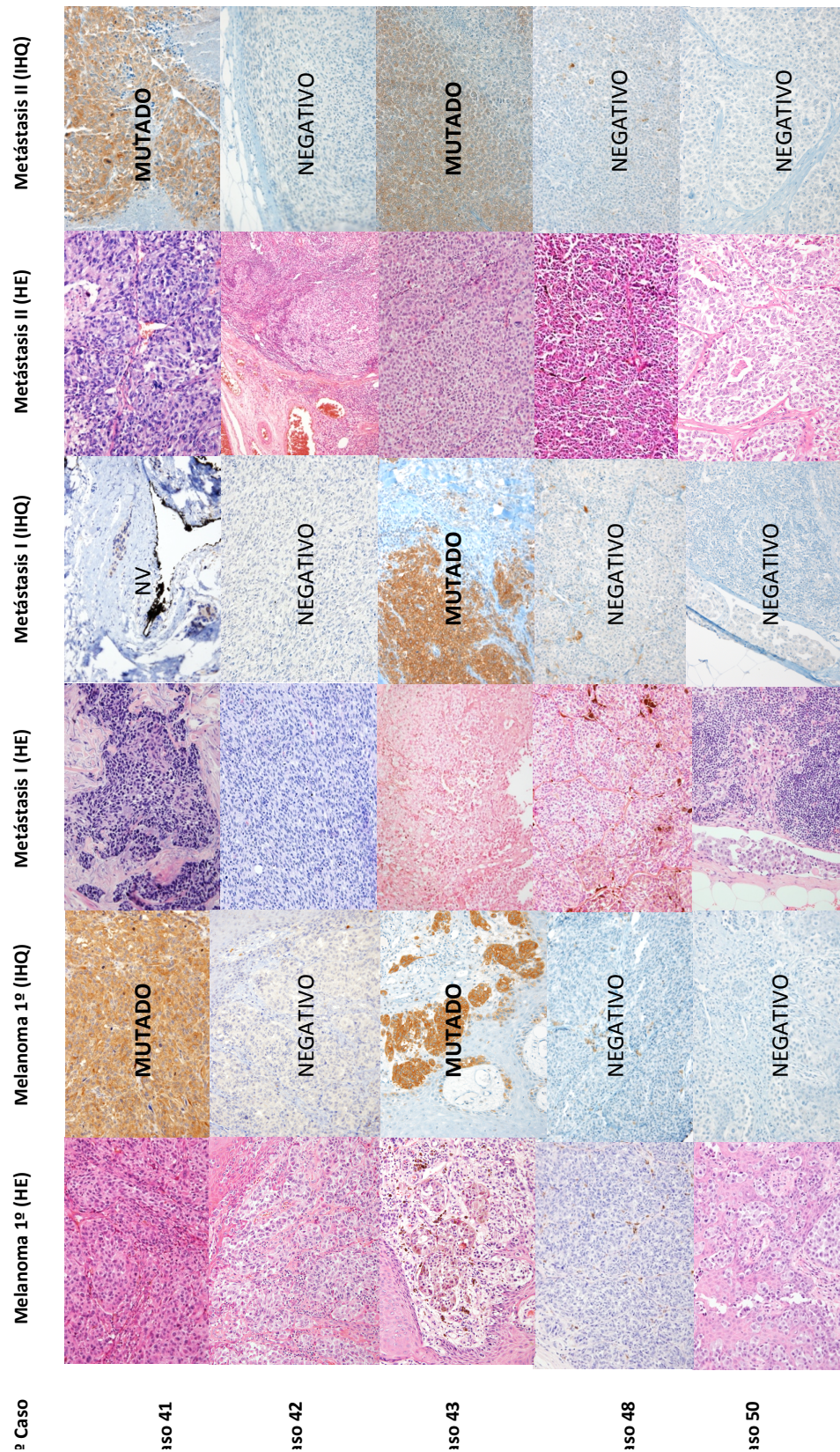


Fig 24. B: Casos discordantes con dos metástasis . Panel representativo de imágenes microfotográficas de los pacientes con casos discordantes mediante H-E e IHQ



Para concluir esta sección, y con el fin de cuantificar la homogeneidad intertumoral, así como la eficacia de la prueba diagnóstica aquí presentada, se estiman las probabilidades condicionadas (mediante un intervalo de confianza de proporciones) de detectar el gen mutado *BRAF* con qPCR (*Cobas® BRAFV600 Mutation Test*) en el melanoma metastásico bajo la hipótesis de que el melanoma primario también presentaba dicho gen.

De los 62 melanomas primarios analizados (uno para cada individuo), 30 no presentaron el gen mutado (WT) bajo la prueba COBAS en el melanoma primario y 32 si lo presentaron (Tabla. 18).

De los 32 que presentaron el gen mutado en el melanoma primario 29 seguían presentándolo (0.906%). En base a la muestra seleccionada se calcula el intervalo de confianza para la probabilidad presentar el gen mutado en el melanoma metastásico bajo la condición de que el melanoma primario también lo presente en

$$IC[p(\text{Metastásico Mutado/Primario Mutado})]=[0.801,1.011]$$

Primario\Metastásico	WT	Mutado	Total
WT	23	7	30
Mutado	3	29	32

Tabla 18: : Número de individuos con gen mutado *BRAF* o WT en melanoma primario y metastásico.

De los 32 que presentaron el gen mutado en el melanoma primario 3 no lo presentaban (0.0937%). En base a la muestra seleccionada se calcula el intervalo de confianza para la probabilidad de no presentar el gen mutado en el melanoma metastásico bajo la condición de que el melanoma primario también lo presente en

$$IC[p(\text{Metastásico WT/Primario Mutado})]=[0,0.199]$$

Por otro lado, analizando los casos en los que en el melanoma primario no se detectaba el gen mutado, la discordancia es un poco mayor. De los 30 individuos que no presentaron el gen mutado en el melanoma primario 23 seguían sin presentarlo (0.7666%). En base a la muestra seleccionada se calcula el intervalo de confianza para la probabilidad de no presentar el gen mutado en el melanoma metastásico bajo la condición de que en el melanoma primario no lo presentaban

$$IC[p(\text{Metastásico WT/Primario WT})]=[0.609,0.925]$$

Por otro lado, de los 30 individuos que no presentaban el gen mutado en el melanoma primario 7 si lo presentaban en el metastásico (0.23%). El intervalo de confianza para esta probabilidad condicionada queda como sigue

$$IC[p(\text{Metastásico Mutado/Primario WT})]=[0.076,0.391].$$

Para concluir este análisis relacionado con la prueba diagnóstica COBAS, se analiza la concordancia, entendiendo la misma como los casos en los que se mantiene (tanto WT con gen mutado) la relación entre el melanoma primario y metastásico. De los 62 individuos analizados, en 52 se mantiene la misma relación (0.838%). El intervalo de confianza para la probabilidad de concordancia queda como sigue:

$$IC[p(\text{Concordancia entre Metastásico y Primario bajo prueba COBAS})]=[0.745,0.932].$$

De manera análoga se puede estimar la probabilidad de discordancia bajo la prueba COBAS para una población de características similares a la muestra seleccionada. De los 62 individuos analizados, en 10 no se mantiene la misma relación (0.1612%). El intervalo de confianza para la probabilidad de concordancia queda como sigue:

$$IC[p(\text{Discordancia entre Metastásico y Primario bajo prueba COBAS})]=[0.068,0.255].$$

Finalmente, para evaluar la eficacia de la prueba diagnóstica aquí presentada se puede estimar la probabilidad condicionada (mediante un intervalo de confianza) de

concordancia entre ambos métodos subiendo a un 0.887% con un intervalo de confianza para la concordancia como sigue

$$IC[p(\text{Concordancia entre Metastásico y Primario bajo prueba diagnóstica})]=[0.807,0.967].$$

disminuyendo a su vez la estimación de probabilidad de discordancia con este nuevo método.

$$IC[p(\text{Discordancia entre Metastásico y Primario bajo prueba diagnóstica})]=[0.033,0.193].$$

4.5. Homogeneidad intermetástasis (MI; MII) en 22 pacientes con metástasis múltiples

De los 22 casos en que registramos más de una metástasis (piel, ganglio y visceral), a través de los tres métodos (Cobas®/IHQ/secuenciación directa), la mutación se mantuvo en el 100% de los casos, presentando homogeneidad intermetástasis para la detección de la mutación $BRAF^{V600}$ (Tabla 19). De las 44 metástasis: 21 eran de piel, 20 de ganglio y una visceral.

Nº caso	PCR MI	IHQ MI	S* MI	PCR MII	IHQ MII	S* MII	Mutación	HOMOGENEIDAD INTER-M
41	M	NV	V600E	WT	+	V600E	V600E	SI
42	M	-	V600K	M	-	V600K	V600K	SI
43	M	+	V600E	WT	+	V600E	V600E	SI
44	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
45	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
46	M	NV	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
47	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
48	M	-	WT	M	-	WT	WT	SI
49	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
50	M	+	WT	WT	-	WT	WT	SI
51	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
52	WT	-	Ø	WT	-	Ø	ND	SI
53	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
54	WT	-	Ø	WT	-	Ø	ND	SI
55	WT	-	Ø	WT	-	Ø	ND	SI
56	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
57	WT	-	Ø	WT	-	Ø	ND	SI
58	WT	-	Ø	WT	-	Ø	ND	SI
59	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
60	M	+	Ø	M	+	Ø	V600E	SI
61	WT	-	Ø	WT	-	Ø	ND	SI
62	WT	+	V600E	WT	+	V600E	V600E	SI

Tabla 19. Homogeneidad intermetástasis. MI: metástasis uno; metástasis dos; ND: NO DETECTADA (negativa para la mutación V600E); Ø: técnica no realizada; S*: secuenciación directa Sanger*

Nº caso	PCR I	IQH I	S* I	PCR MI	IQH MI	S* MI	PCR MII	IQH MII	S* MII			
1	M	+	V600E	WT	+	V600E	<div>Caso discordante</div> <div>Mutado</div> <div>WT (silvestre)</div> <div>No estudiado</div> <div>NV No valorable</div> <div>+/- Positivo/negativo</div>					
2	M	+		M	+							
3	WT	-		WT	-							
4	WT	-		WT	-							
5	WT	-		WT	-							
6	WT	-		WT	NV							
7	WT	-		WT	-							
8	WT	-		W	-							
9	M	+		M	+							
10	M	+		M	+							
11	M	+		M	+							
12	M	+		M	+							
13	M	+		M	+							
14	M	+		M	+							
15	M	+		M	+							
16	WT	-		WT	-							
17	WT	-		WT	-							
18	M	+	V600E	WT	+	WT						
19	WT	-	WT	-								
20	WT	-	WT	-								
21	M	+	M	+								
22	M	+	M	+								
23	M	+	M	+								
24	WT	-	WT	-								
25	WT	-	WT	-								
26	M	+	M	NV								
27	WT	+	V600E	M	+	V600E						
28	M	+		M	+							
29	M	NV		M	+							
30	M	-	V600K	WT	-	V600K						
31	WT	-	WT	-								
32	WT	-	WT	-								
33	WT	-	WT	-								
34	M	+	M	+								
35	WT	-	WT	-								
36	M	+	M	+								
37	M	+	M	+								
38	M	+	M	+								
39	M	+	M	+								
40	WT	-	V600K	M	-	V600K						
41	WT	+	V600E	M	NV	V600E	WT	+	V600E			
42	WT	-	V600K	M	-	V600K	M	-	V600K			
43	WT	+	V600E	M	+	V600E	WT	+	V600E			
44	M	+		M	+		M	+				
45	M	+		M	+		M	+				
46	M	+		M	NV		M	+				
47	M	NV		M	+		M	+				
48	WT	-	WT	M	-	WT	M	-	WT			
49	M	+		M	+		M	+				
50	WT	-		WT	M		-	WT		WT	-	WT
51	M	+		M	+		M	+				
52	WT	-		WT	-		WT	-				
53	M	+		M	+		M	+				
54	WT	-		WT	-		WT	-				
55	WT	-		WT	-		WT	-				
56	M	+		M	+		M	+				
57	WT	-		WT	-		WT	-				
58	WT	-		WT	-		WT	-				
59	M	+		M	+		M	+				
60	M	+		M	+		M	+				
61	WT	-		WT	-		WT	-				
62	WT	+	V600E	WT	+	V600E	WT	+	V600E			





 Caso discordante
 Mutado
 WT (silvestre)
 No estudiado
 NV No valorable
 +/- Positivo/negativo

Tabla 20. Tabla de contingencia

4.6. Homogeneidad intratumoral mediante IHQ

La homogeneidad intratumoral de la expresión de BRAF^{V600E} se evaluó en 146 muestras teñidas con el anticuerpo VE1. Entre los especímenes examinados, 77 (32 melanomas primarios y 45 metástasis) fueron positivos con la tinción anticuerpo VE1. Todos los casos mostraron expresión BRAF^{V600E} homogénea en toda la superficie tumoral de las preparaciones valoradas. Ninguno de los especímenes presentó subclones positivos y negativos dentro del mismo tumor. Las diferencias de tinción sólo se observaron en zonas necróticas o por una tinción con artefactos (Fig. 25).

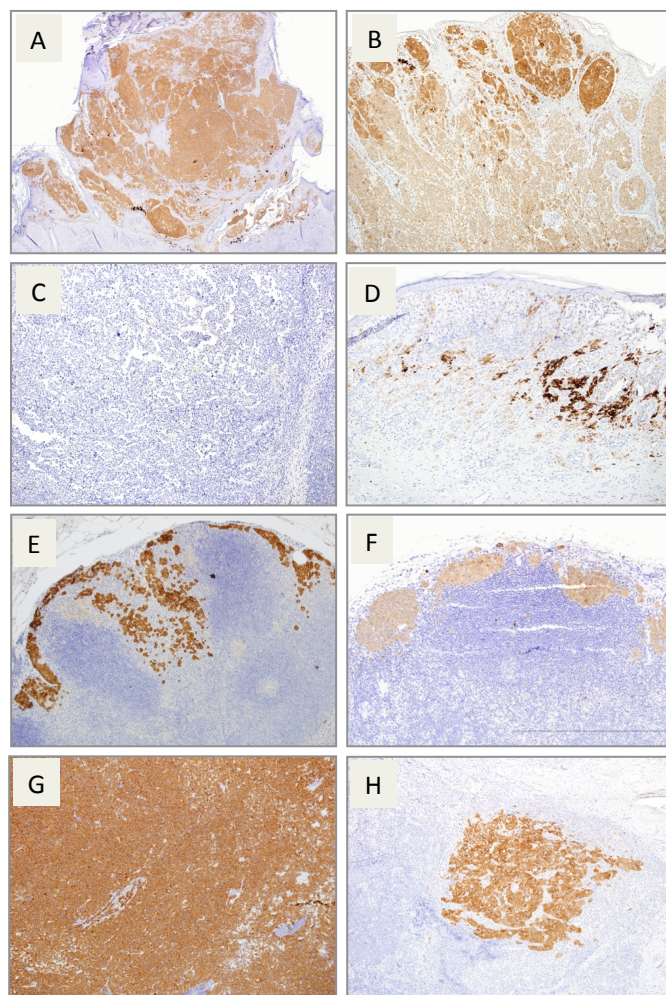


Figura 25. Microfotografías representativas de anti-VE1. A: (x2) Expresión intensa y difusa (melanoma primario); B: (x2) Expresión positiva (nevus asociado a melanoma); C: (x10) Ausencia de expresión (negativo); D: (x4) Ausencia de expresión en melanoma, expresión en melanófagos dérmicos; E y F: (x4) Expresión intensa y difusa en metástasis subcapsulares ganglionares (positivo); G: (x10) Tinción positiva de forma homogénea (ganglionar); y H: (x10) Expresión intensa y difusa en metástasis ganglionares intranodales.

4.7. Asociaciones clínicopatológicas de la presencia de la mutación de $BRAF^{V600}$

4.7.1. $BRAF^{V600}$ y perfil clínico de los pacientes estudiados

Tras aplicar el algoritmo diagnóstico de la mutación de $BRAF$ (Cobas®, anticuerpo monoclonal de ratón VE1 y secuenciación directa, Sanger®) en nuestro trabajo, identificamos la mutación en 38 de los 62 pacientes estudiados. Al analizar las muestras en detalle, pudimos observar que la mutación de $BRAF^{V600}$ estaba presente en 89/146 (60,96%) del total de los tumores analizados. En concreto, 38/62 (61,29%) de los melanomas primarios y 51/84 (60,71%) de las metástasis (Tabla 21).

	BRAF -	BRAF +	Total
Melanoma primario		38 (61,29%)	62
Metástasis		51 (60,71%)	84
		89 (60,96%)	146

Tabla 21. Distribución de la mutación $BRAF^{V600}$ en la muestra (melanoma primario y metástasis)

4.7.1.1. Edad y sexo

En este apartado, valoramos la distribución de los casos $BRAF^{V600}$ mutado asociada al sexo (varones y mujeres), y calculamos la mediana de edad de diagnóstico asociada a la presencia o no, de la mutación $BRAF^{V600}$.

La mediana de edad de diagnóstico de los pacientes que presentaban la mutación de $BRAF$ fue significativamente menor comparada con aquellos pacientes sin mutación. La mediana de edad de diagnóstico en los pacientes con melanomas mutados fue de 52,00 años, y la mediana de edad de diagnóstico en los pacientes con melanomas no mutados, 70,50 años ($p < 0,001$). Al realizar el contraste de igualdad de medianas entre la población de individuos con o sin presencia de mutación se obtiene un p-valor inferior a 0.001 por lo que se rechaza la hipótesis de que ambas poblaciones tengan la misma mediana. Se observa por tanto que la edad es significativamente distinta en ambos grupos.

Por otro lado, para determinar el grado de dependencia entre la variable sexo y la presencia o no de mutación, no se observaron diferencias significativas ($p=0,660$) en las proporciones, por lo que se puede concluir que no existe relación significativa entre ambas variables. Así, de los 38 pacientes con melanomas primarios con la mutación *BRAF*, 20 (32,26%) eran varones y 18 (29,03%) eran mujeres. En los melanomas estudiados sin mutación: 14 (22,58%) eran varones y 10 (16,13%) eran mujeres ($p=0,660$) (Tabla 22).

	BRAF -	BRAF +	<i>p</i>
Edad (años)	70,50	52,00	<0,001
Sexo			
Varón	14 (22,58%)	20 (32,26%)	0,660
Mujer	10 (16,13%)	18 (29,03%)	

Tabla 22. Sexo y edad asociado a la presencia de la mutación *BRAF*^{V600}

4.7.1.2. Localización del melanoma primario

En esta sección, analizamos la existencia de relación entre la localización y la presencia o no presencia en el melanoma primario del gen mutado. La localización del melanoma primario asociada a la presencia de la mutación ha alcanzado resultados significativos a un nivel de significación del 0,05. La localización más frecuente asociada a melanomas que albergaban la mutación *BRAF* fue el tronco 16 (25,81%). A continuación, las extremidades: 10 (16,13%), cabeza y cuello: 7 (11,29%), y acrales: 5 (8,06%). Los melanomas no mutados se distribuyeron: 4 (6,45%) en cabeza y cuello, 7 (11,29%) en tronco, 2 (3,23%) en extremidades y 11 (17,74%) acrales ($p=0,026$) (Tabla 23).

Localización M1º	BRAF +	BRAF -
Cabeza y cuello	7 (11,29%)	4 (6,45%)
Tronco	16 (25,81%)	7 (11,29%)
Extremidades	10 (16,13%)	2 (3,23%)
Manos/pies	5 (8,06%)	11 (17,74%)
<i>p</i>	0,026	

Tabla 23. Localización del melanoma primario asociado a la presencia de la mutación BRAF^{V600}

4.7.1.3. Localización y tipo de metástasis

De las 46 metástasis de piel, 29 (63,04%) presentaban la mutación BRAF^{V600}, de las 16 metástasis ganglionares 16/33 (45,71%) estaban mutadas, así como 5/5 (100,00%) viscerales. Las metástasis fueron analizadas según su localización (en tránsito, a distancia y viscerales). Las metástasis en tránsito mostraron una tendencia estadísticamente significativa. De los pacientes BRAF mutados, 13 (23,64%) presentaban metástasis en tránsito, y 19 (34,55%) no; de los pacientes sin mutación, 8 (14,55%) no presentaban metástasis en tránsito y 15 (27,27%) sí ($p=0,072$). En las metástasis ganglionares la diferencia no fue significativa: los melanomas negativos para la mutación: 6 (10,34%) no tenían metástasis ganglionares y 15 (25,86%) sí; y en los mutados: 11 (18,97%) no presentaban extensión ganglionar y 26 (44,83%) sí ($p=0,926$). La diferencia en las metástasis a distancia tampoco fue significativa: melanomas mutados: 9 (16,07%) no tenían metástasis a distancia y 26 (46,43%) sí; y melanomas no mutados: 7 (12,50%) sin metástasis a distancia y 14 (25,00%) sí ($p=0,541$) (Tabla 24).

Localización metástasis		BRAF +	BRAF -
M. en tránsito ($p=0,072$)	Sí	13 (23,64%)	15 (27,27%)
	No	19 (34,55%)	8 (15,55%)
M. ganglionar	Sí	26 (44,83%)	15 (25,86%)
	No	11 (18,97%)	6 (10,34%)
M. a distancia	Sí	26 (46,43%)	14 (25,00%)
	No	9 (16,07%)	7 (12,50%)

Tabla 24. Localización de metástasis asociado a la presencia de la mutación BRAF^{V600}

4.7.2. $BRAF^{V600}$ y características histopatológicas de los pacientes estudiados

4.7.2.1. Tipo de melanoma primario

Se estudió la dependencia o grado de asociación entre las variables nominales presencia de mutación $BRAF$ y los cuatro subtipos histológicos de melanoma (MES, LMM, MN y MLA). De forma significativa el tipo más frecuente con estado mutacional $BRAF$ positivo fue el MES 26 (41,94%), seguido de MN: 6 (9,68%), MLA 5 (8,06) y LMM 1 (1,61%). En los no mutados: 7 (11,29%) MES, 3 (4,84%) LMM, 3 (4,84%) MN y 11 (17,74%) MLA ($p=0,005$) (Tabla 25). Cabe destacar que se rechaza la hipótesis nula ($p=0,005$) de que ambas variables sean independientes por lo que el grado de relación entre ambas variables es significativo.

Tipo histológico	BRAF -	BRAF +	<i>p</i>
MES	7 (11,29%)	26 (41,94%)	0,005
MN	3 (4,84%)	6 (9,68%)	
LMM	3 (4,84%)	1 (1,61%)	
MLA	11 (17,74%)	5 (8,06%)	

Tabla 25. Tipo de melanoma asociado a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$

4.7.2.2. Índice de Breslow

La mediana del índice de Breslow fue mayor en los no mutados, pero sin significación estadística. La mediana del índice de Breslow en los no mutados fue 3,50 (1,00-18,10 mm), y la mediana del índice de Breslow en los mutados fue 2,99 (0,45-14,52) mm ($p=0,386$) (Tabla 26). La enorme variabilidad del índice de Breslow en las dos poblaciones (positivo y negativo), hace que aunque la mediana del índice de Breslow es mayor en la población sin el gen mutado 3.5 frente a 2.99, esa diferencia no es significativa.

	BRAF -	BRAF +	<i>p</i>
Mediana del índice de Breslow (rango) mm	3,50 (1,00- 18,10) mm	2,99 (0,45- 14,52) mm	0,386

Tabla 26. Mediana del índice de Breslow (mm) asociada a la presencia de la mutación $BRAF^{V600}$

4.7.2.3. Nivel de Clark

Para evaluar la existencia de relación entre las variables BRAF (positivo o negativo) y la variable ordinal nivel de Clark, se realiza un contraste de homogeneidad de Pearson. A continuación, se presenta la tabla de contingencia entre ambas variables en la que se observa una clara independencia entre ambas variables. Para el contraste de independencia de la ji-cuadrado da lugar a un $p=0,888$ por lo que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis de independencia (Tabla 27).

		Clark		
		III	IV	V
		Recuento	Recuento	Recuento
PCR Cod	BRAF-	12	14	4
(0 wild type, 1 mutado)	BRAF+	14	13	5

Tabla 27. Nivel de Clark asociada a la presencia de la mutación BRAF^{V600}

De este análisis puede concluirse que para la muestra seleccionada la relación entre ambas variables es muy poco significativa.

4.7.2.4. Ulceración en el melanoma primario

De los 62 melanomas estudiados, 31 no presentaban ulceración y 31, sí. En los que se describió ausencia de ulceración en 22 (35,48%), eran BRAF mutados, frente a los 16 (25,81%) del grupo de melanomas no mutados; y de los melanomas sin mutación: 9 (15,52%) no la presentaban y 15 (24 (19%) sí. La diferencia no fue significativa ($p=0,118$) (Tabla 28).

Ulceración	BRAF -	BRAF +	<i>p</i>
si	9 (14,52%)	22 (35,48%)	0,118
no	15 (24,19%)	16 (25,81%)	

Tabla 28. Ulceración en el melanoma primario asociada a la presencia de la mutación BRAF^{V600}

4.7.2.5. Inflamación en el melanoma primario

Para evaluar la existencia de relación entre las variables BRAF (positivo o negativo) y la variable ordinal inflamación (si o no) se realiza un contraste de homogeneidad de Pearson o test de independencia. A continuación se presenta la tabla de contingencia entre ambas variables en la que se observa una baja y no significativa dependencia entre ambas variables. El contraste de independencia de la ji-cuadrado da lugar a un $p=0,309$ por lo que no hay evidencia estadística para rechazar la independencia (Tabla 29).

		BRAF -	BRAF +
		Recuento	Recuento
Ulceración	NO	13	18
	SI	17	14

Tabla 29. Inflamación en el melanoma primario asociada a $BRAF^{V600}$

Las proporciones de BRAF positivo y negativo no son significativamente distintas en melanomas con ulceración y sin ulceración.

4.7.3. Asociaciones clínicopatológicas de la forma de la mutación $BRAF^{V600K}$

4.7.3.1. $BRAF^{V600K}$ y perfil clínico de los pacientes estudiados

Un subgrupo de casos son aquellos que presentaban la mutación $BRAF^{V600K}$, que en nuestra muestra correspondía a tres pacientes.

4.7.3.1.1. Edad y sexo

La mediana de edad de diagnóstico fue significativamente mayor en los pacientes que presentaban la mutación V600K frente a la V600E. Así, la mediana de edad de diagnóstico en los melanomas que albergaban la mutación V600K fue de 70,00 años (65,00-87,00), frente a 51,00 (23,00-64,00) en los $BRAF^{V600E}$ ($p<0,001$).

La diferencia según el sexo en los melanomas que albergan la mutación V600K no ha obtenido resultados significativos ($p=0,711$). Así, los melanomas sin mutación eran 14 (22,58%) varones y 10 (16,13%) mujeres; melanomas V600E: 19 (30,65%) varones y 16 (25,81%) mujeres; y melanomas V600K: un (1,61%) varón y dos (3,23%) mujeres (Tabla 30).

	BRAF -	V600E	V600K	<i>p</i>
Edad (años)	70,50 (29,00-86,00)	51,00 (23,00-81,00)	70 (65,00-87,00)	<0,001
Sexo				
Varón	14 (22,58%)	19 (30,65%)	1 (1,61%)	0,711
Mujer	10 (16,13%)	16 (25,81%)	2 (3,23%)	

Tabla 30. Edad y sexo asociados a melanomas con la mutación BRAF^{V600K}

4.7.3.1.2. Localización del melanoma primario

La localización de los melanomas primarios V600K obtuvo una tendencia estadística significativa ($p=0,073$): cabeza y cuello 1/3 (1,61%), 2/3 (3,23%) tronco, o en extremidades, y en pies/manos 0,00%. Melanomas sin mutación: 4 (6,45%) cabeza y cuello, 7 (11,29%) tronco, 2 (3,23%) extremidades y 11 (17,74%) manos/pies; melanomas V600E: 6 (9,68%) cabeza y cuello, 14 (22,58%) tronco, 10 (16,13%) extremidades y 5 (8,06%) manos/pies (Tabla 31).

Localización M1 ^a	BRAF -	V600E	V600K
Cabeza y cuello	4 (6,45%)	6 (9,68%)	1 (1,61%)
Tronco	7 (11,29%)	14 (22,58%)	2 (3,23%)
Extremidades	2 (3,23%)	10 (16,13%)	0 (0,00%)
Acral	11 (17,74%)	5 (8,06%)	0 (0,00%)
<i>p</i>	0,073		

Tabla 31. Localización melanoma primario asociado a melanomas con la mutación BRAF^{V600K}

4.7.3.1.3. Localización y tipo de metástasis

Las metástasis en tránsito presentaron una tendencia significativa ($p=0,066$). Los 3 pacientes V600K (5,45%) tuvieron metástasis en tránsito. En cuanto a las metástasis ganglionares y viscerales las diferencias no fueron significativas: metástasis en tránsito: melanomas sin mutación, 15 (27,27%) frente a 13 (23,6%) con mutación V600E y a 8 (14,55%) sin metástasis y BRAF - y a 19 (34,55%) sin metástasis en tránsito y BRAF + (Tabla 32).

Localización metástasis		BRAF +	BRAF -
M. en tránsito ($p=0,066$)	Sí	13 (23,64%)	15 (27,27%)
	No	19 (34,55%)	8 (15,55%)
M. ganglionar	Sí	26 (44,83%)	15 (25,86%)
	No	11 (18,97%)	6 (10,34%)
M. a distancia	Sí	26 (46,43%)	14 (25,00%)
	No	9 (16,07%)	7 (12,50%)

Tabla 32. Localización y tipo de metástasis asociada a la mutación $BRAF^{V600K}$

4.7.3.2. $BRAF^{V600K}$ y características histopatológicas de los pacientes estudiados

4.7.3.2.1. Tipo melanoma primario

El subtipo de melanoma con la mutación $BRAF^{V600K}$ presentó un resultado estadísticamente significativo: 2/3 (3,23%) MES; LMM 1/3 (1,61%) ($p=0,006$), frente a los melanomas sin mutación: 7 (11,29%) MES, 3 (4,84%) LMM, 3 (4,84%) MN, 11 (17,74%) MLA y los melanomas V600E: 14 (38,71%) MES, 0 (0,00%) LMM, 6 (9,68%) MN, 5 (8,06%) MLA (Tabla 33).

Tipo	BRAF -	V600E	V600K	p
MES	7 (11,29%)	24 (38,71%)	2 (3,23%)	0,006
MN	3(4,84%)	6 (9,68%)	0 (0,00%)	
LMM	3 (4,84%)	0 (0,00%)	1 (1,61%)	
MLA	11 (17,74%)	5 (8,06%)	0 (0,00%)	

Tabla 33. Tipo de melanoma asociado a la presencia de la mutación BRAF^{V600K}

4.7.3.2.2. Índice de Breslow.

La mediana del índice de Breslow de los melanomas V600K no fue significativa (mediana del índice de Breslow de pacientes V600K, 1,90 (1,2-2,80); mediana del índice de Breslow de pacientes V600E, 3,00 (0,45-4,42); y la mediana del índice de Breslow de aquellos melanomas sin mutaciones, 3,50 (1,00-18,10))(p=0,209) (Tabla 34).

	BRAF -	BRAFV600E	BRAFV600K	p
índice de Breslow (rango) mm	3,50 (1,00-18,10)	3,00 (0,45-4,42)	1,90 (1,20-2,80)	0,209

Tabla 34. Índice de Breslow asociado a la presencia de la mutación BRAF^{V600K}

4.8. Grado de acuerdo entre qPCR frente IHQ

4.8.1. Sensibilidad y especificidad para BRAF^{V600}

Cabe recordar que el termino sensibilidad en un análisis estadístico de naturaleza médica suele acuñarse a la capacidad de una prueba diagnóstica para dar como casos positivos los casos realmente enfermos; proporción de enfermos correctamente identificados. Es decir, la sensibilidad caracteriza la capacidad de la prueba para detectar la enfermedad en sujetos enfermos. Por otro lado, la especificidad, nos indica la capacidad para dar como casos negativos los casos realmente sanos; proporción de sanos correctamente identificados. Es decir, la especificidad caracteriza la capacidad de la prueba para detectar la ausencia de la enfermedad en sujetos sanos.

En este apartado, analizamos la capacidad de detectar la mutación $BRAF^{V600}$ mediante IHQ frente a cobas®; y la especificidad, asumiendo independencia de melanomas. Considerando Cobas® como *gold standard*, hemos calculado la sensibilidad y la especificidad del anticuerpo VE1 en nuestra serie de 146 tumores. Excluimos 6 casos en los que no se obtuvo resultado de IHQ. De los 140 restantes, 10 (7,1%) casos fueron considerados como negativos por *Cobas Mutation Test*®, y positivos por IHQ. Por el contrario, 7 (5%) casos mutados por cobas®, fueron negativos por IHQ. Sobre estos datos, la sensibilidad del anticuerpo monoclonal de ratón VE1 frente a cobas®, ha sido del 90,67%, y la especificidad, 84,62%.

4.8.2. Valores predictivos para $BRAF^{V600}$

La proporción de pacientes con resultados de la prueba positivos con la mutación, valor predictivo positivo (VPP) fue 87,17%; y la proporción de resultados negativos del método diagnóstico en los que han sido diagnosticados correctamente, valor predictivo negativo (VPN) fue 91,94%.

4.8.3. Coeficiente kappa ponderado para $BRAF^{V600}$

El coeficiente kappa mide el grado de acuerdo observado en dos o más pruebas diagnósticas binarias. En nuestro estudio, el índice kappa entre el resultado del cobas® y la IHQ en las 140 muestras de tumor primario y metástasis fue 0,755 (Bueno).

4.8.4. Medidas de sensibilidad, especificidad e índice de correlación kappa para la mutación $BRAF^{V600E}$

4.8.4.1. Sensibilidad y especificidad para la mutación $BRAF^{V600E}$

Analizamos la capacidad de detectar la mutación $BRAF^{V600E}$ mediante IHQ frente a cobas®. Así como su especificidad. Considerando cobas como *gold standard*, hemos calculado la sensibilidad y la especificidad del anticuerpo VE1 en nuestra serie de 146 tumores. Excluimos además de los casos con resultados no valorables (NV), 3 casos (7 tumores) en los que detectamos la mutación $BRAF^{V600K}$, por lo que nos quedamos con

133 muestras en total. De las 133 restantes, 10 (7,5%) casos fueron considerados negativos por *Cobas Mutation Test*®, y positivos por IHQ. Por el contrario, 3 (2,3%) casos son considerados mutados por *cobas*®, se observaron como negativos por IHQ. Sobre estos datos, la sensibilidad del anticuerpo monoclonal de ratón VE1 frente a *cobas*® es 95,78%, y la especificidad, 83,87%.

4.8.4.2. Valores predictivos para la mutación *BRAF*^{V600E}

La proporción de pacientes con resultados de la prueba positivos con la mutación, valor predictivo positivo (VPP) fue 90,67%; y la proporción de resultados negativos del método diagnóstico en los que han sido diagnosticados correctamente, valor predictivo negativo (VPN) fue 94,55%

4.8.4.3. Coeficiente kappa ponderado para la mutación *BRAF*^{V600E}

El coeficiente kappa para la detección de la mutación V600E, excluyendo los casos con mutación V600K fue 0,834 (Excelente).

4.9. Análisis uni y multivariante para supervivencia global

Variable	Univariante (n=62)			Multivariante (n=62)		
	HR	95% IC	P	HR	95% CI	P
Edad	1,02	0,98- 1,02	0,602			
Sexo			0,381			
Mujer	1,00					
Varón	1,34	1,01 – 4,06				
Tipo de melanoma			0,852			
MES	1,00					
MN	1,78	0,41- 7,91				
LMM	0,82	0,24- 2,85				
MLA	0,94	0,43 -2,05				
Localización del melanoma primario			0,528			
Cabeza y cuello	1,00					
Tronco	1,01	0,38–2,27				
Extremidades	0,51	0,61 -1,61				
Acrales	0,98	0,35- 2,76				
Índice de Breslow			0,062			0,038
1-3	1,00			1,00		
4	1,95	0,96–3,93		2,19	0,95 –4,61	
Nivel de Clark			0,788			
III	1,00					
IV	1,27	0,63–2,58				
V	1,11	0,24 – 5,01				
Ulceración			0,854			
Sí	1,00					
No	0,93	0,48–1,83				
Inflamación			0,018			0,017
Sí	1,00			1,00		
No	2,28	1,14 –4,52		2,26	1,14 a 4,53	
BRAF			0,917			
Silvestre	1,00					
Mutado V600	0,97	0,49 – 1,89				
BRAF			0,666			
Silvestre	1,00					
Mutado V600E	0,91	0,45 – 1,88				
Mutado V600K	1,59	0,46 – 5,55				

HR: hazard ratio; CI: intervalo de confianza

Tabla 35. Análisis uni y multivariante para la supervivencia global con melanoma

De los 62 pacientes incluidos en el estudio, se ha realizado análisis univariante de las variables recogidas (edad, sexo, tipo de melanoma, localización del melanoma primario, nivel de Clark, ulceración en el melanoma primario y inflamación en el melanoma primario) en relación a su evolución.

La presencia de inflamación en el tumor primario se comportó como un factor asociado a mejor supervivencia global ($p=0,018$). De esta forma, la ausencia de

inflamación incrementó el riesgo de muerte (coeficiente de riesgo HR=2,28, intervalo de confianza 95%: 1,14 –4,52).

Además, se estudió la influencia del índice de Breslow. Se hicieron dos grupos de melanomas, los melanomas con Breslow menor de 4 mm (T1-T3), y aquellos melanomas mayores de 4 mm (T4). Observamos que los melanomas con índice de Breslow mayor de 4 mm, presentaban una tendencia a la disminución de la supervivencia global ($p=0,062$) (coeficiente de riesgo HR=1,95, intervalo de confianza 95%: 0,96-3,93) frente a los melanomas menores de 4 mm, cuya supervivencia fue mayor.

En el estudio multivariado de supervivencia global, el índice de Breslow y la inflamación son factores pronósticos independientes. Un índice de Breslow de 4 incrementó el riesgo de muerte ($p=0,038$; coeficiente de riesgo HR=2,19, intervalo de confianza 95%: 0,95–4,61). Finalmente, la ausencia de inflamación también se asoció a peor supervivencia ($p=0,017$; coeficiente de riesgo HR=2,26, intervalo de confianza 95%: 1,14–4,53) (Tabla 35).

4.10. Análisis de la supervivencia global

4.10.1. Supervivencia global de la muestra

En nuestra serie de casos, se calculó la supervivencia global. De los 62 casos valorados, 35 (58,33%) fallecieron por el melanoma y un caso, por otro motivo. El resto, 25 (41,67%) viven hasta la fecha de corte. La mediana de la supervivencia global de los pacientes estudiados en la muestra fue 4,501 (3,562-7,027) años (Fig. 26).

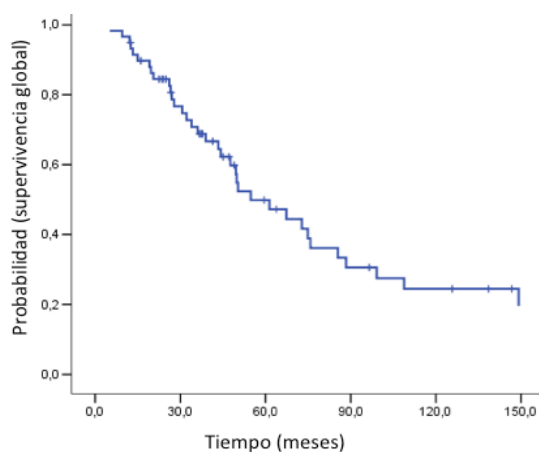


Figura 26. Análisis de supervivencia global de la muestra

4.10.2. Análisis de supervivencia global en pacientes que presentan la mutación $BRAF^{V600}$

Analizamos la mediana de la supervivencia global de los pacientes que presentaban la mutación frente a aquellos sin mutación. La mediana de supervivencia global en el grupo de melanomas que presentaban la mutación $BRAF^{V600}$ fue mayor que en aquellos que no la presentan, obteniendo resultados no estadísticamente significativos ($p=0,867$). La mediana de supervivencia global en pacientes sin la mutación fue 4,501 (2,644-6,230) años, y la mediana de supervivencia global en pacientes que albergan la mutación fue 5,53 (3,20- 8,15) años (Fig. 27).

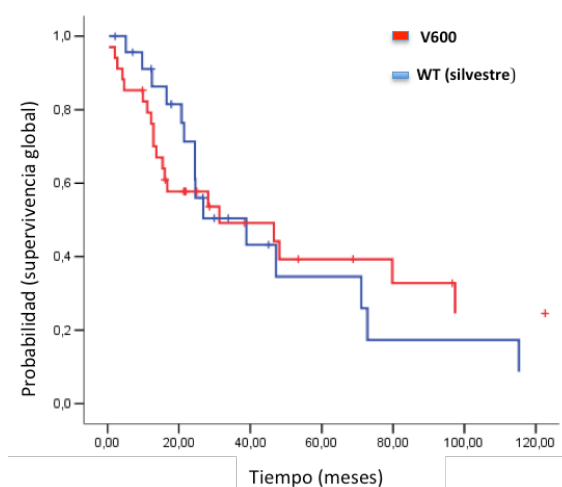


Figura 27. Análisis de supervivencia global entre pacientes mutados y no mutados (meses). V600: —; WT (silvestre): —

4.10.3. Variables clínicas estudiadas en el análisis de supervivencia global en nuestra muestra (n:62)

4.10.3.1. Supervivencia global asociada al sexo

Se calculó la mediana de la supervivencia global asociada al sexo de los 62 pacientes incluidos en la muestra. La mediana de supervivencia global en los pacientes varones fue 5,044 (3,200-12,241) años, y en el grupo de mujeres fue 4,501 (2,211-8,151) años. Los resultados no fueron significativos ($p=0,517$) (Fig. 28). De los 35 fallecidos, 17 (48,48%) eran varones y el resto, 18 (30,77%) mujeres.

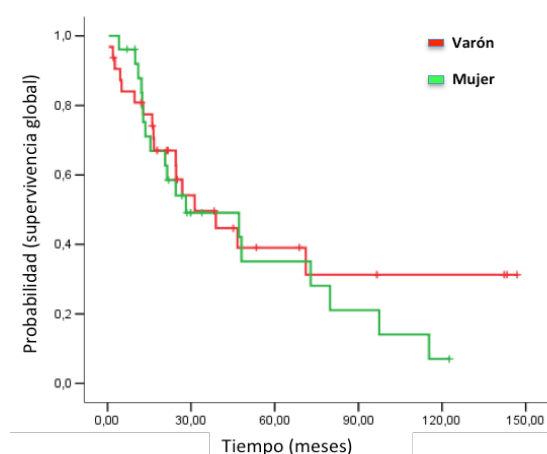


Figura 28 . Supervivencia global asociado al sexo (meses). Varón: —; Mujer: —

4.10.3.2. Supervivencia global asociada al tipo de melanoma

El análisis de la supervivencia global según el tipo de melanoma no fue significativo ($p=0,914$). La mediana del análisis de supervivencia global en MES fue 4,134 (2,967-8,151) años, en LMM fue 3,638 (2,142-6,175) años, en MN fue 3,638 (0,233-4,456) y en MLA fue 5,044 (2,181-8,745) años (Fig. 29).

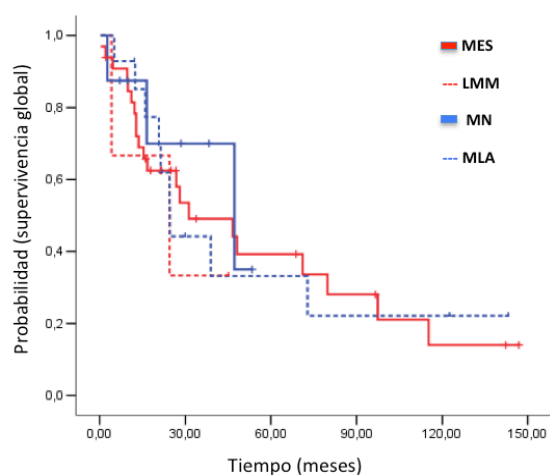


Figura 29. Supervivencia global asociada a tipo de melanoma primario (meses). MES: —; LMM: ...; MN: —; MLA: ...

4.10.3.3. Supervivencia global asociada a la localización de melanoma primario

Estudiamos la posible influencia de la localización del melanoma primario en la supervivencia global. Los 62 melanomas se agruparon en cuatro grupos: cabeza y cuello, tronco, extremidades y acrales. El análisis de supervivencia según la localización del melanoma primario no fue significativo ($p=0,403$). La mediana del análisis de supervivencia global en melanomas de cabeza y cuello fue 4,096 (0,778-12,245) años, en melanomas del tronco fue 4,134 (2,515-7,027) años, en melanomas en extremidades fue 8,151 (2,211-11,851) años y en melanomas de localización acral fue 5,044 (2,181-6,230) años (Fig. 30).

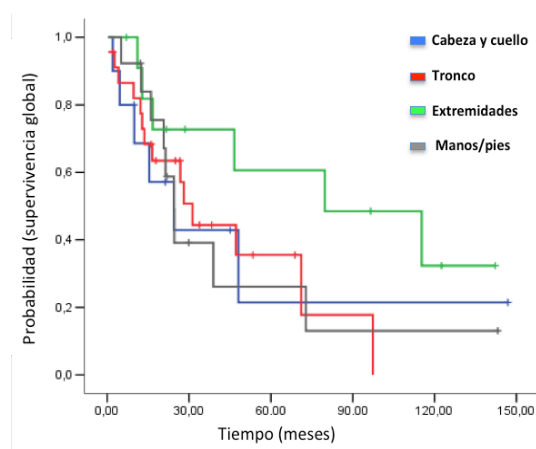


Figura 30. Supervivencia global asociada a la localización del melanoma primario (meses). Cabeza y cuello: —; tronco: —; extremidades: —; y acral: —

4.10.4. Variables histopatológicas estudiadas en el análisis de supervivencia global

4.10.4.1. Supervivencia global asociada al Índice de Breslow

El índice de Breslow fue una variable histológica de gran importancia en el pronóstico, y corresponde a la T de la clasificación TNM (T1: menor que 1,00; T2: 1,01-2,00; T3: 2,02-4,00 y T4 >4,00). La diferencia de las medianas del análisis de supervivencia global según el índice de Breslow no fue significativa ($p=0,522$) (Fig. 31).

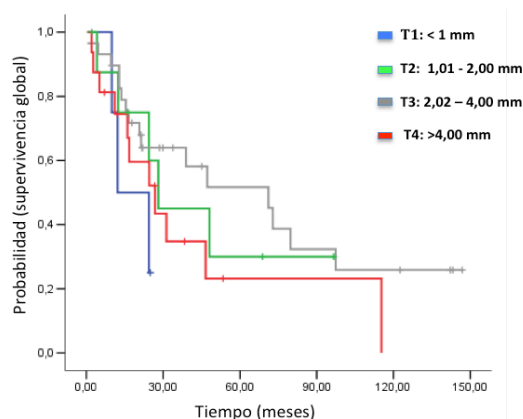


Figura 31. Supervivencia global asociada al índice de Breslow (meses). < 1,00: —; 1,01-2,00: —; 2,02-4,00: —; y > 4,00: —

4.10.4.2. Supervivencia global asociada al Nivel de Clark

Clasificamos los melanomas primarios metastásicos según el nivel de infiltración en las capas de la piel, mediante los niveles de Clark. El estudio de las diferencias entre las medianas de los niveles de Clark III, IV y V, no fueron significativas ($p=0,471$). La mediana del análisis de supervivencia global para nivel de Clark III fue 6,133 (2,211-12,241) años, para el nivel de Clark IV fue 4,50 (3,200-6,230) y para el nivel de Clark V fue 1,333 (0,141-4,450) (Fig. 32).

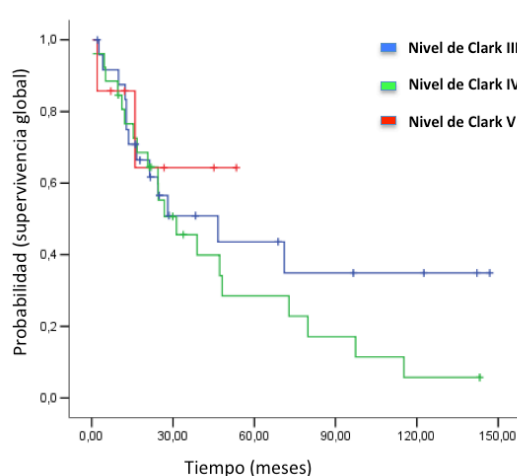


Figura 32. Supervivencia asociado al nivel de Clark (meses). Nivel de Clark III: —; Nivel de Clark IV: —; y nivel de Clark V: —

4.10.4.3. Supervivencia global asociada a la presencia de ulceración en el melanoma primario

Dentro de las variables histológicas, la presencia o no de ulceración es un valor pronóstico en el melanoma. La diferencia entre las medianas del análisis de supervivencia global asociada a la existencia o no de ulceración, no obtuvo una diferencia significativa ($p=0,741$). La mediana de la supervivencia global fue 3,915 (2,515-6,153) años en los melanomas no ulcerados y 5,986 (3,562-8,151) años en los ulcerados (Fig. 33).

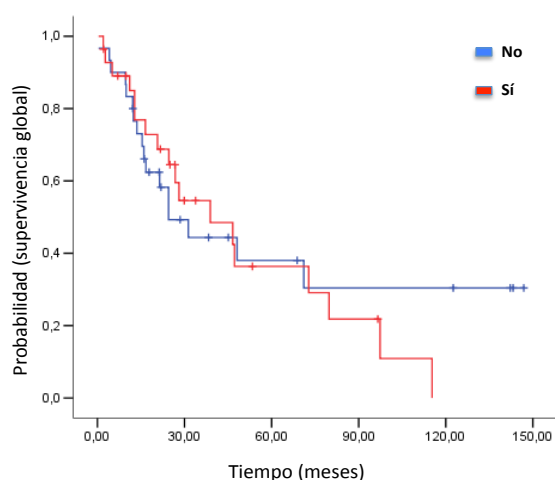


Figura 33. Supervivencia global asociada a la presencia de ulceración en el melanoma primario (meses) no: —; si: —

4.11. Análisis univariante para supervivencia libre de enfermedad

Variable	Univariante (n=62)		
	HR	95% IC	P
Edad	1,01	0,91- 1,24	0,392
Sexo			0,714
Mujer	1		
Varón	0,91	0,53 – 1,53	
Tipo de melanoma			0,809
MES	1		
MN	1,46	0,44- 4,83	
LMM	1,37	0,62- 3,30	
MLA	0,91	0,53 -1,83	
Localización del melanoma primario			0,457
Cabeza y cuello	1		
Tronco	1,21	0,55–2,68	
Extremidades	0,67	0,28 -1,63	
Acrales	1,06	0,45- 2,43	
Índice de Breslow			0,159
1-3	1		
4	1,51	0,85–2,69	
Nivel de Clark			0,543
III	1		
IV	1,04	0,60–1,81	
V	1,6	0,68 – 3,75	
Ulceración			0,757
Sí	1		
No	0,91	0,54–1,56	
Inflamación			0,026
Sí	1		
No	1,86	1,07 –3,21	
BRAF			0,844
Silvestre	1		
Mutado V600	1,05	0,62 – 1,79	
BRAF			0,251
Silvestre	1		
Mutado V600E	0,99	0,57 – 1,70	
Mutado V600K	2,27	0,80 – 9,23	

HR: hazard ratio; CI: intervalo de confianza

Tabla 36. Análisis univariante para supervivencia libre de enfermedad

En el estudio univariado de la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con melanoma las variables estudiadas: edad, sexo, tipo de melanoma (MES, LMM, MLA y MN), localización del melanoma primario (cabeza y cuello, tronco, extremidades, acrales), índice de Breslow, nivel de Clark, ulceración, inflamación, presencia de la mutación $BRAF^{V600}$, no fueron factores pronósticos independientes en nuestra muestra (Tabla 36).

4.12. Análisis de supervivencia libre de enfermedad

4.12.1. Análisis de supervivencia libre de enfermedad de la muestra

Se calculó la supervivencia libre de enfermedad en nuestra serie de 62 casos. Estaba compuesta por melanomas que presentaban la mutación y melanomas sin la mutación. Se calculó la mediana de supervivencia libre de enfermedad que fue 5,044 (3,63-7,027) años (Fig. 34).

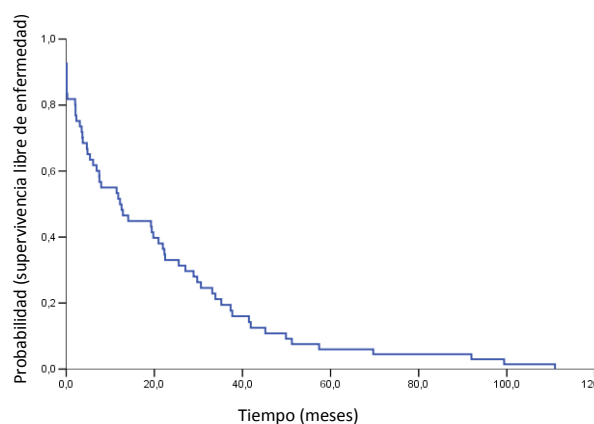


Figura 34. Supervivencia libre de enfermedad de la muestra (meses)

4.12.2. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en pacientes que presentaban la mutación $BRAF^{V600}$

Comparamos la supervivencia libre de enfermedad entre el grupo de pacientes que presentaban la mutación $BRAF^{V600}$, y los que no la presentaban. La diferencia entre

ambos grupos no tuvo diferencias significativas ($p=0,389$). La mediana del grupo de pacientes sin la mutación fue 5,004 (2,789-12,263) años, comparada con los melanomas positivos para la mutación $BRAF^{V600}$ que fue 5,534 (3,200-8,151) años (Fig. 35).

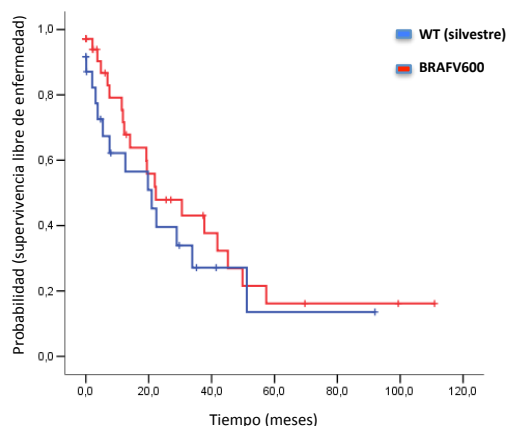


Figura 35. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes positivos para la mutación $BRAF^{V600}$, frente a melanomas en los que no se detectó la mutación mediante las pruebas diagnósticas empleadas en el estudio (meses). V600: —; WT: wild type: —

4.12.3. Variables clínicas estudiadas en el análisis de supervivencia libre de enfermedad en nuestra muestra

4.12.3.1. Supervivencia libre de enfermedad asociada al sexo

En nuestra serie de 62 pacientes del Hospital 12 de Octubre con melanomas en estadio avanzados se ha valorado la supervivencia libre de enfermedad de todos los casos, en el conjunto de melanomas con la mutación de $BRAF$ y sin ella. La diferencia de las medianas del análisis de supervivencia libre de enfermedad según el sexo no fue significativa ($p=0,530$). La mediana de la supervivencia libre de enfermedad en varones fue 1,625 (0,384-2,099) años, mientras que en mujeres fue 1,058 (0,567-2,375) años (Fig. 36).

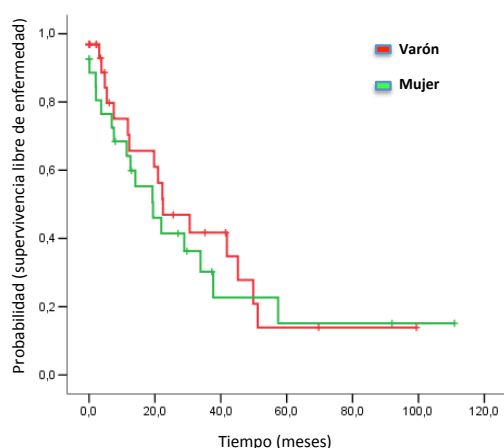


Figura 36. Supervivencia libre de enfermedad asociado al sexo (meses). Varón: —; Mujer: —

4.12.3.2. Supervivencia libre de enfermedad asociada al tipo histológico de melanoma

Se incluyeron cuatro tipos de melanoma primario: MES, MN, MM, MLA y calculamos la posibles diferencias en la supervivencia libre de enfermedad entre los cuatro tipos de melanoma. La diferencia de las medianas del análisis de supervivencia libre de enfermedad según el tipo de melanoma primario no fue significativa ($p=0,861$). La mediana de supervivencia libre de enfermedad fue MES fue 1,595 (0,395-2,893) años, en LMM fue 1,714 (1,625) años, en MN fue 1,003 (0,000-2,444) años y MLA fue 0,811 (0,019-1,844) años (Fig. 37).

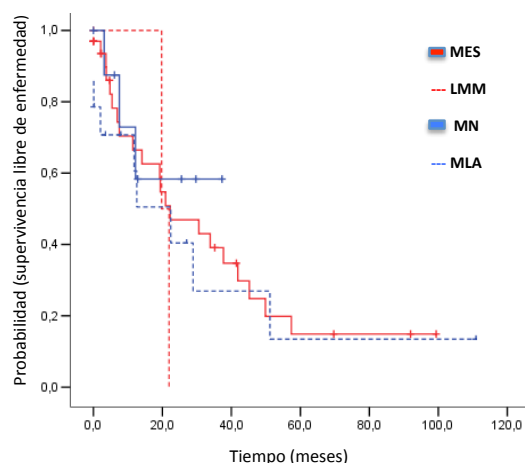


Figura 37. Supervivencia libre de enfermedad asociada a tipo de melanoma (meses). MES: —; LMM: ...; MN: —; MLA: ...

4.12.3.3. Supervivencia libre de enfermedad asociada a la localización de melanoma primario

La diferencia de las medianas del análisis de supervivencia libre de enfermedad según la localización del melanoma primario no fue significativa ($p=0,386$). La mediana de supervivencia libre de enfermedad en melanomas localizados en cabeza y cuello fue 3,066 (0,173-3,408) años, la mediana de los melanomas del tronco es 0,940 (0,395-

2,099) años, en las extremidades fue 1,595 (0,170-2,784) años y en los acrales fue 0,652 (0,005-1,723) años (Fig. 38).

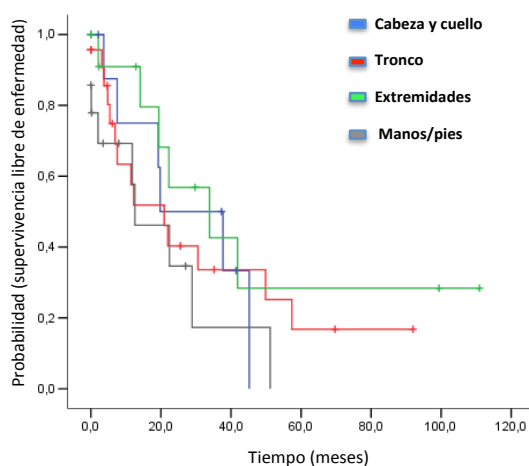


Figura 38. Supervivencia libre de enfermedad asociada a la localización del melanoma primario (meses). Cabeza y cuello: —; tronco: —; extremidades —; y acral: —

4.12.4. Variables histopatológicas estudiadas en el análisis de supervivencia libre de enfermedad en nuestra muestra

4.12.4.1. Supervivencia libre de enfermedad según el Índice de Breslow

Se midió el índice de Breslow en todos los melanomas primarios incluidos en la muestra. El índice de Breslow es una variable histológica de gran importancia pronóstica, y corresponde a la T de la clasificación TNM (T1: menor que 1,00; T2: 1,01-2,00; T3: 2,02-4,00 y T4 >4,00).

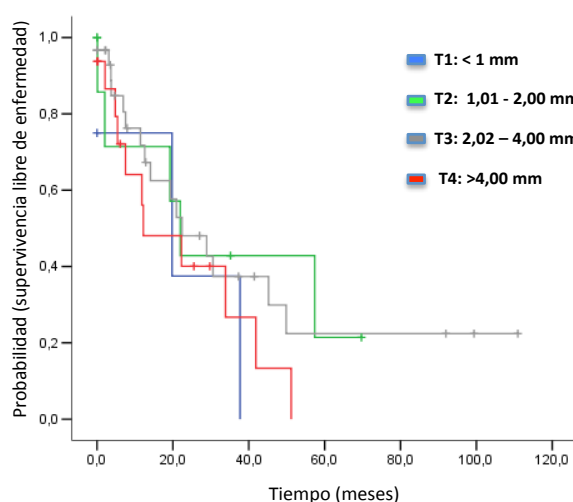


Figura 39. Supervivencia libre de enfermedad asociada al índice de Breslow (meses). < 1,00: —; 1,01-2,00: —; 2,02-4,00: —; y > 4,00: —

La diferencia de las medianas del análisis de supervivencia según el índice de Breslow no fue significativa ($p=0,494$) (Fig. 39).

4.12.4.2. Supervivencia libre de enfermedad asociado al nivel de Clark

La diferencia de las medianas del análisis de supervivencia libre de enfermedad según el nivel de Clark (III,IV,IV) no fue significativa ($p=0,352$).

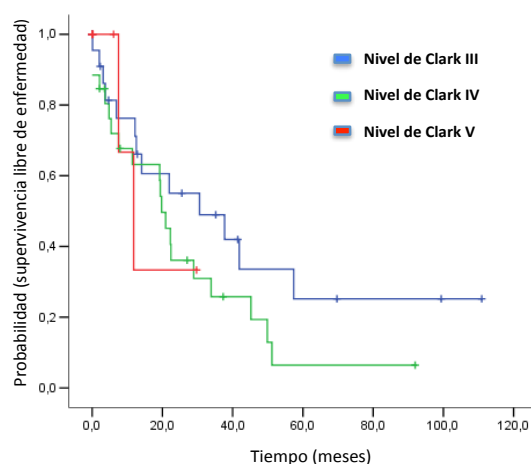


Figura 40. Supervivencia libre de enfermedad según el nivel de Clark. Nivel de Clark III: —; Nivel de Clark IV: —; y nivel de Clark V: —

La mediana de la supervivencia libre de enfermedad en los melanomas Nivel de Clark III fue 1,107 (0,307-2,723) años, Nivel de Clark IV fue 1,595 (0,444-1,844) años y en aquellos con Nivel de Clark V fue 0,501 (0,000-2,444) años (Fig. 40).

4.12.4.3. Supervivencia libre de enfermedad asociada a la presencia de ulceración en el melanoma primario

La diferencia de las medianas del análisis de supervivencia libre de enfermedad según la presencia o no de ulceración (si/no) no ha alcanzado resultados significativos ($p=0,683$). La mediana de la supervivencia libre de enfermedad en melanomas sin ulceración fue 1,058 (0,307-1,81) años, y en melanomas ulcerados fue 1,156 (0,444-2,444) años (Fig. 41).

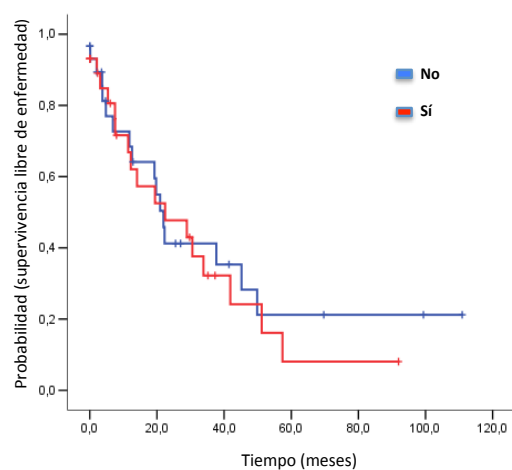


Figura 41. Supervivencia libre de enfermedad según la presencia de ulceración en el melanoma primario (meses).
No: —; sí: —

5. DISCUSIÓN

5.1. Características clínicopatológicas de los melanomas con mutación *BRAF*^{V600}

La detección de la mutación de *BRAF*, se ha convertido en uno de los principales temas de investigación en el melanoma. Las nuevas terapias dirigidas, los inhibidores de *BRAF* (vemurafenib y dabrafenib) y MEK (trametinib), han demostrado un aumento de la supervivencia global y de la supervivencia libre de enfermedad en esta enfermedad.^{89,149,150} Tres de los principales problemas de los nuevos tratamientos son:

- La elección de la muestra tumoral a estudio (tumor primario o sus metástasis: a distancia o locorregionales, número de muestras que se deben estudiar, y sí se debe buscar la mutación en cada nueva metástasis);¹⁵¹⁻¹⁵³
- La búsqueda de pruebas diagnósticas reproducibles, rápidas y accesibles;
- Los mecanismos de resistencia a los inhibidores de la vía MAPK.

La activación de nuevas mutaciones a medida que progresa el tumor o la presencia de subclones de diferentes mutaciones en el mismo tumor, se han propuesto como mecanismos de resistencia a las nuevas terapias dirigidas.

En nuestra serie de 62 pacientes (62 melanomas primarios y 84 metástasis), estudiamos la heterogeneidad tanto intratumoral como intertumoral del melanoma, a través de dos métodos diagnósticos: uno molecular real time-PCR de tipo cualitativo (*Cobas® BRAFV600 Mutation Test*); y otro no molecular, la detección de la expresión de proteínas *BRAF*^{V600E} (anticuerpo monoclonal de ratón VE1). En los casos discordantes la técnica utilizada como *gold standard* fue la secuenciación directa Sanger®.

5.1.1. Frecuencia de la mutación en la muestra

El proto-oncogén *BRAF* codifica la quinasa *BRAF*, miembro de la familia de serina/treonina quinasas citoplasmáticas *RAF*.⁹ La mutación se produce por un cambio de timina por adenina en la posición 600, en el exón 15, esto conlleva la sustitución de

valina por glutamato (GTG a GAG). La mutación de *BRAF* se ha descrito en el 50% de los casos de melanoma (27-70%).^{9,44,45} La forma *BRAF*^{V600E} de la mutación de *BRAF* en el melanoma es la más frecuente descrita, hasta en 70-90% de los casos.⁴⁴

En nuestra serie, más de la mitad de los pacientes se podría haber beneficiado del tratamiento con vemurafenib, por albergar la mutación *BRAF*^{V600}. Se ha demostrado respuesta a vemurafenib aunque con distinta eficacia en melanomas con mutación *BRAF*^{V600E}, *BRAF*^{V600K} y *BRAF*^{V600R}.¹⁵⁴ La positividad de la mutación la observamos en el 60,96% (89/146) de nuestras muestras analizadas, el 61,29% (38/62) de los melanomas primarios, y el 60,71% (51/84) de los tumores metastásicos, similar a los resultados descritos en la literatura.^{36,37,69} Las formas de la mutación *BRAF*^{V600} que hemos detectado en nuestro grupo de pacientes fueron *BRAF*^{V600E} (29 casos) y *BRAF*^{V600K} (3 casos). La detección de la forma *BRAF*^{V600K} es importante ya que se ha demostrado que también responde a los tratamientos con inhibidores de *BRAF*, como se ha descrito en el ensayo Fase III de vemurafenib (BRIM-3),⁸⁶ entre otros trabajos.⁴⁵

Otro de los aspectos que se está investigando en la literatura, es la correlación entre la presencia de la mutación de *BRAF* en el melanoma y determinadas características clínicopatológicas del melanoma.^{35,53,155}

5.1.2. Parámetros clínicopatológicos estudiados

Las variables clínicas que hemos estudiado en el presente trabajo son: la edad al diagnóstico, sexo, y la localización del melanoma primario (cabeza y cuello, tronco, extremidades y acrales); y en las metástasis, el tipo (piel, ganglio y visceral) y la localización (en tránsito, ganglionar y a distancia). En el apartado de las variables histológicas evaluamos el subtipo histológico (MES, MN, LMM y MLA), el índice de Breslow, el nivel de Clark, y la presencia de ulceración e infiltrado inflamatorio en el melanoma primario. Solo encontramos diferencias significativas en la edad al diagnóstico, la localización y el subtipo histológico de melanoma con respecto a la presencia de la mutación de *BRAF*. Estos hallazgos son similares a los estudios

publicados.^{36,155} Y observamos una tendencia significativa en la variable, presencia de metástasis en tránsito en los melanomas con la mutación.

5.1.3. Edad de diagnóstico

Se ha descrito que la mediana de edad de diagnóstico de los pacientes con *BRAF* mutado es menor que la de los pacientes que no presentan la mutación.^{33,35,36,53,146,155-}

¹⁵⁸ En nuestra serie, la mediana de la edad de diagnóstico de los pacientes que presentaban la mutación fue significativamente menor que en los pacientes sin mutación (mediana de edad de diagnóstico en los mutados, 52,00 años; mediana de edad de diagnóstico en los no mutados 70,50 años) ($p<0,001$). Estos datos coinciden con los observados en otras series. En el trabajo de Viros y cols., la mediana de la edad de diagnóstico fue 66 años en la muestra, y en aquellos pacientes con la mutación 51 años; en un trabajo de Long y cols., fue de 63,1 años en el total de la serie, frente a 55,8 años en los casos con la mutación. Lee y cols., en un metanálisis, en el que se recogieron 36 estudios, en el que acumularon 2521 pacientes, entre los años 1989 y 2010,³⁷ encontraron asociación con la localización y el subtipo histológico de melanoma, pero no con la edad (al contrario que estudios previos) y el sexo.³⁷ En otros estudios epidemiológicos de melanoma, se describe la asociación entre localizaciones con exposición solar intermitente (tronco y extremidades), el sexo femenino y diagnóstico a edades tempranas; mientras que, aquellos melanomas diagnosticados en edades avanzadas, sobre todo se presentan en localizaciones de exposición solar crónica (cabeza y cuello) y en hombres.^{32,155,159} Long y cols., estudiaron la frecuencia y tipo de mutaciones *BRAF* en el melanoma metastásico y su correlación con determinados perfiles clínico-patológicos. Obtuvieron que el 48% de los pacientes tenían el gen *BRAF* mutado (V600E: 74%; V600K: 20% y el 6% otros genotipos). Y los melanomas que presentaban la mutación *BRAF* eran fundamentalmente MES y MN, presentaban un mayor número de mitosis, eran melanomas primarios únicos, la ubicación predominante era el tronco, y la edad en el momento del diagnóstico del tumor primario era menor de 50 años.³⁶

5.1.4. Tipo de melanoma

Al estudiar en nuestra muestra, la distribución de los cuatro subtipos histológicos de melanoma, encontramos que la mutación *BRAF*^{V600} se hallaba en mayor proporción en MES, 26/62 (41,94%) y en MN, 6/62 (9,68%) ($p=0,005$). Este resultado coincide con lo descrito por la mayoría de los autores^{30-32,155}. El grupo de Sasaki y cols., estudió 35 melanomas primarios en pacientes japoneses BRAF positivos de los cuales el 50% eran MES y finos.³⁰ Curtin y cols., analizaron la mutación *BRAF* y *NRAS* en 126 melanomas, y observaron que la mayoría de las mutaciones de *BRAF* correspondían a MES en áreas de exposición solar intermitente.³² Lang y cols., estudiaron 52 melanomas primarios e identificaron la mutación *BRAF*^{V600} en el 29% (17/52) de los MES y en el 27% (11/52) de MN.³¹ Los resultados en series posteriores mantienen la relación entre el tipo de melanoma y la presencia de la mutación *BRAF*^{V600}.^{33,35,36,101,155,160} Lee y cols., en su metanálisis, detectaron con mayor frecuencia la mutación de *BRAF* en MES y en los melanomas de áreas de exposición solar intermitente.³⁷ Por último, el grupo de Yaman y cols., identificaron la mutación en el 42,5% de los melanomas especialmente en los MES.¹⁵⁵

5.1.5. Localización del melanoma primario

La localización del melanoma primario es otra variable clínica en la que se ha hallado significación estadística y en la que hemos coincidido con los diferentes estudios publicados.^{27,33,35} En nuestro estudio, la proporción mayor de melanomas que albergaban la mutación de *BRAF* fue en aquellos melanomas que estaban localizados en el tronco ($p=0,026$). En el trabajo de Liu y cols., se detectó la mutación de *BRAF*^{V600} en 112/251 (45%) de los melanomas primarios, la mayoría eran MES, mostraban escasos signos de daño actínico, y estaban localizados en el tronco o en extremidades (OR=9,0).³³ Viros y cols., en una muestra de 302 melanomas, demostraron también que el subtipo más frecuente de melanoma primario era MES, y la localización mayoritaria era el tronco.³⁵ Los melanomas en piel con daño solar crónico como sucede en la cara, mostraron características moleculares diferentes en comparación

con melanomas que surgían en piel fotoexpuesta de forma intermitente.²⁷ En resumen, el perfil de melanomas que presentan la mutación de *BRAF*^{V600} es: MES, localizados en el tronco y extremidades, áreas exposición solar intermitente y diagnosticados a edades más tempranas.³⁵

5.1.6. Características histológicas en melanomas BRAF +

En el melanoma, algunos autores han intentado integrar los datos clínicos, histopatológicos y moleculares, en una búsqueda de una nueva clasificación clínico-patológica. Así, Viros y cols. observaron que la ulceración, la extensión pagetoide con formación de nidos de melanocitos intraepidérmicos, el engrosamiento de la epidermis, la demarcación nítida con la piel circundante y la presencia de células tumorales más grandes, redondas, y pigmentadas se asociaba con mayor frecuencia a melanomas con la mutación *BRAF*.³⁵ Nosotros no hemos encontrado asociación con la ulceración lo que coincide con los hallazgos obtenidos por otros autores.³⁶ Otros aspectos estudiados, han sido el espesor (índice de Breslow), y la tasa de mitosis del melanoma primario. Se ha contemplado una mayor asociación y frecuencia de mutación en melanomas metastásicos más finos, y su presencia en estos melanomas, se ha asociado a un peor pronóstico.^{33,37,141,161} En otros trabajos, sin embargo, no han encontrado relación de la mutación con el índice de Breslow.^{36,162} En nuestro estudio, no logramos identificar una diferencia significativa entre la frecuencia de la mutación en melanomas primarios y el espesor de Breslow. El parámetro presencia de inflamación tampoco ha obtenido resultados significativos. Este último hecho, ha sido también valorado por otros autores como Edlundh-Rose y cols., y sí, identificaron una mayor proporción de infiltración linfocitaria en los melanomas BRAF positivos ($p=0,013$).⁵³

5.2. Homogeneidad intertumoral de la mutación $BRAF^{V600E}$ mediante RT-PCR e IHQ entre melanoma primario y sus metástasis

La diferencia entre el estado mutacional del tumor primario y sus metástasis, o entre las metástasis del mismo melanoma, podría ser un mecanismo de resistencia primario a las nuevas terapias dirigidas contra el melanoma. La descripción inicial de que la mutación $BRAF^{V600}$ se mantenía a medida que progresaba el tumor, conocida como homogeneidad intertumoral,¹⁶³ contrastaba con lo observado en otros cánceres, en los que se había demostrado la existencia de policlonalidad en la progresión tumoral,¹⁶⁴ lo que podría justificar las resistencias identificadas en algunos tratamientos.

El carácter heterogéneo del melanoma es conocido.¹⁶⁵ Por otro lado, algunos trabajos habían descrito discordancias entre distintas muestras de melanoma del mismo paciente (Tabla 37).^{95,98,99,140,158,166} Para tratar de esclarecer estas discordancias, nos propusimos estudiar la posible heterogeneidad entre el melanoma primario y las metástasis de cada paciente, en una serie de melanomas pareados, aplicando dos métodos diagnósticos, *Cobas® BRAV600 Mutation Test* y otra técnica no molecular, el anticuerpo monoclonal de ratón VE1. Observamos, al estudiar los melanomas con qRT-PCR, que 10 pacientes de los 62 pacientes valorados, no mantenían el estado de la mutación inicial en las metástasis, es decir, que existía una discordancia del 16,13% (10/62). Dado que *Cobas® BRAV600 Mutation Test* detecta además de la mutación de $BRAF^{V600E}$ otras mutaciones de $BRAF^{V600}$, con menor sensibilidad por reactividad cruzada ($BRAF^{V600E2}$, $BRAF^{V600K}$, $BRAF^{V600D}$);⁷⁶ y que la IHQ, solo detecta en principio $BRAF^{V600E}$, se completó el estudio realizando secuenciación directa Sanger® a los diez casos. Observamos que tres casos de los casos presentaban la mutación $BRAF^{V600K}$ (caso 30, caso 40 y caso 42), con lo que explicaríamos la discordancia.⁷⁶ En los casos 48 y 50, el resultado de la secuenciación directa, fue WT para todas las muestras, por lo que repetimos los resultados de qPCR (*Cobas®*) que fue WT en el segundo análisis. Así, consideramos los primeros resultados iniciales, como falsos positivos de la primera

prueba. Estos falsos positivos del Cobas®, podrían ser explicados por errores en la técnica, como la contaminación por ADN de otras muestras. En los casos 1, 18, 27, 41 y 43, los resultados falsos negativos para PCR, y positivos para el anticuerpo y la secuenciación directa, pudieron ser motivados por la existencia de un porcentaje bajo de celularidad, lo que hace que la sensibilidad de la técnica sea inferior a la IHQ y a la secuenciación directa Sanger®. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la idea de la homogeneidad intertumoral para la mutación *BRAF*^{V600E}.^{101,167,168}

El porcentaje de discordancia en nuestra serie (16,13%), obtenido mediante Cobas®, es similar a la discrepancia mostrada por otros grupos que han utilizado diferentes métodos diagnósticos moleculares (13,5-44%).^{95,98,99} Yancovitz y cols., en una muestra de 112 tumores estudiaron la presencia de la mutación de *BRAF*^{V600E}, mediante dos técnicas moleculares (secuenciación convencional y específica MS-PCR), y encontraron un desfase entre la sensibilidad de las mismas. Por lo que concluyeron, que además de la posible pérdida de sensibilidad de estas técnicas por contaminación del estroma tumoral normal, podría haber intervenido también la presencia de otros subclones de *BRAF* de tipo silvestre que hubiesen interferido en el resultado. Para confirmar esta hipótesis, seleccionaron los tumores de 19 pacientes con múltiples metástasis y mediante MS-PCR (sin microdissección) estudiaron la mutación *BRAF*^{V600E}. Se encontraron que en 5/19 (26%) de los pacientes presentaban discordancia entre sus muestras tumorales. En 18 pacientes a los que se les había analizado el tumor primario y sus metástasis, el 44% (8/18) no mantuvieron el estado mutacional. Seis de los casos discordantes no presentaban la mutación en el tumor primario, pero sí en las metástasis. Con estos resultados sugirieron la posible policlonalidad del melanoma.⁹⁵ En el mismo año, el grupo de trabajo de Colombino y cols., sometieron a estudio a 132 pacientes (291 muestras tumorales, entre melanomas primarios y metástasis) a las mutaciones de *BRAF*, *NRAS* y *p16CDKN2A*. El 43% de los tumores presentaron la mutación de *BRAF*. Las mutaciones de *BRAF*/*NRAS* eran más frecuentes en tumores metastásicos (63%) que en los primarios (58%). Se halló una discordancia de las mutaciones de *BRAF*/*NRAS* del 15% (15 pacientes) entre el melanoma primario y sus

metástasis.⁹⁹ En 2013, Heinzerling y cols. estudiaron mediante pirosecuenciación, 300 muestras de melanoma, de las cuales el 45,5% en los tumores primarios y el 51,3% de las metástasis fueron BRAF positivas. En 53 pacientes que aportaban al estudio múltiples muestras, se estudió también la heterogeneidad intertumoral que se identificó en 10 pacientes (18,9%).⁹⁸ El grupo de Saint-Jean y cols., analizaron mediante amplificación alelo específica y secuenciación directa Sanger un total de 367 tumores (278 pacientes). La mutación de *BRAF* fue hallada en 152 muestras (41,4%), la discrepancia que encontraron fue de 13,5%, en 10 de los 74 pacientes incluidos con metástasis múltiples.¹⁵⁸ Saroufim y cols., en una muestra de 95 tumores, compararon el estado mutacional mediante IHQ y PCR. La muestra estaba compuesta por 40 melanomas primarios y sus metastasis (n=42), recidivas (n=9) y segundas metástasis (n=4). En nueve pacientes se incluyeron más de una metástasis. La mutación de *BRAF*^{V600E} ha sido identificada en el 35,4% de los melanomas primarios y en el 18,9% de las metástasis. Las discordancias entre melanoma primario y sus metástasis mediante IHQ fue del 27,5% y mediante PCR fue mayor, 32,3%. La concordancia entre metástasis fue del 100% (6 casos comparados).¹⁶⁹ Bradish y cols., analizaron el estado mutacional (BRAF V600E/E2, V600K, V600D, y V600R) mediante BRAF RGQ PCR kit (Qiagen) en 25 pacientes. Cuatro pacientes (16%) tuvieron discrepancias entre el primario y sus metástasis. De estos, dos (8%) presentaron positividad para BRAF^{V600} en el melanoma primario con negatividad para BRAF en las metástasis y dos (8%) pacientes tenían BRAF negativo en el melanoma primario y positivo en las metástasis. Los autores concluyeron que la discrepancia del estado mutacional del melanoma primario y sus metástasis no era infrecuente y que sería prudente repetir el análisis en aquellos previamente negativos.¹⁷⁰

Autor	Año (mes)	Revista	Nº muestras	Métodos diagnósticos
Houben y cols.	2004 (Marzo)	<i>J. Carcinog.</i>	200 (174 pacientes)	Secuenciación directa
Yancovitz y cols.	2012 (Enero)	<i>Plos One</i>	112 (73 pacientes)	MS-PCR; secuenciación convencional
Colombino y cols.	2012 (Junio)	<i>J Clin Oncol</i>	291 (132 pacientes)	Secuenciación directa de ADN automatizada (PCR) (macrodissección)
Heinzerling y cols.	2013 (Noviembre)	<i>Br J Cancer</i>	300 (187 pacientes)	Pirosecuenciación; secuenciación capilar (macrodissección); IHQ
Saint-Jean y cols.	2014 (Mayo)	<i>Oncol Rep</i>	367 (278 pacientes)	allele-specific amplification; Secuenciación Sanger (macrodissección)
Saroufim y cols.	2014 (Diciembre)	<i>Exp Mol Pathol</i>	95 (40 pacientes)	IHQ; PCR
Bradish y cols.	2015 (Abril)	<i>Mod Pathol</i>	(25 pacientes)	BRAF RGQ PCR kit (Qiagen)

Tabla 37. Heterogeneidad intertumoral

En todos estos estudios, se han empleado técnicas moleculares para obtener la mutación. Este tipo de técnicas, pueden estar influenciadas por la pureza de las células tumorales ya que precisan una celularidad elevada, y además, no podemos garantizar la concentración del ADN tumoral.^{167,171} La selección de muestras con abundante infiltrado inflamatorio y células estromales hace que la sensibilidad y especificidad de las técnicas disminuya.

Por otra parte, se ha comercializado recientemente un nuevo anticuerpo monoclonal de ratón VE1, cuya validación para el estudio de la mutación BRAF^{V600E} ha demostrado una alta sensibilidad y especificidad.⁴² Algunos autores han propuesto introducirlo en el algoritmo diagnóstico, como método de *screening*, asociado a otro método molecular.^{171,172} Así, el grupo de trabajo de Lade-Keller y cols., estudiaron en 28 melanomas primarios la mutación mediante anticuerpo monoclonal VE1 y Cobas® BRAFV600 Mutation Test y compararon la sensibilidad de estas dos pruebas diagnósticas. El anticuerpo fue positivo en 13 muestras (46%), de las cuales cuatro

casos fueron negativos para *Cobas® BRAFV600 Mutation Test* curiosamente, en estos la celularidad tumoral era inferior 10%, al no utilizar macro o microdissección.¹⁷¹ Esto demuestra la bondad de la IHQ que es independiente de la fracción celular tumoral. Otra ventaja de la IHQ que se ha visto, es la capacidad de seleccionar el área a estudio y así, delimitar mejor la que corresponde al melanoma, especialmente en los casos asociados a nevus. Las discordancias halladas en los primeros trabajos podrían haber sido motivadas por el empleo de métodos moleculares en muestras demasiado pequeñas o por la escasa pureza del ADN tumoral en las muestras seleccionadas de melanoma primario o de las metástasis (algunas técnicas moleculares son incapaces de detectar con precisión la presencia de mutaciones en tejidos cuyo contenido de ADN tumoral es inferior al 25%) o por realizar el análisis en melanomas primarios no causantes de la progresión de la enfermedad.¹⁰² Por lo que debemos actuar con precaución en pacientes con múltiples primarios, especialmente si el primario tiene un estadio bajo, una recurrencia no regional o si el periodo de progresión no es el esperado.

En contra de estos hallazgos referidos en la literatura y en desacuerdo con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, existen estudios similares al nuestro en los que se defiende la homogeneidad intertumoral. Curiosamente, en estas series se emplean métodos moleculares e IHQ. Boursalt y cols., en un estudio de 230 tumores (88 melanomas primarios) en estadios III y IV en el que emplearon la inmunotinción con anti BRAF^{V600E} y HRM, solo encontraron discordancia intertumoral en 4 pacientes (4,5%). Uno de los cuales tenía otro melanoma. En otros dos casos, cuyos melanomas

primarios eran BRAF^{WT} propusieron que las mutaciones detectadas en las metástasis, BRAF^{L597S} y BRAF^{D594N}, se pudieron haber adquirido durante la progresión tumoral. La homogeneidad intertumoral se mantuvo en el 100% entre las metástasis de un mismo tumor primario lo mismo que ocurrió en nuestros casos; y en el 90,09% entre tumor

primario y metástasis.¹⁰¹ Menzies y cols., en 64 pacientes (171 tumores) estudiaron la mutación mediante IHQ entre los tumores de cada paciente valorando también la intensidad de inmunotinción.¹⁶⁷ Demostraron homogeneidad intertumoral (tasa de concordancia 100%). Por último, Pearlstein y cols. en su serie de 76 pacientes con melanomas metastásicos demostraron una concordancia del 100% para el anticuerpo VE1 igual que lo que observamos en nuestra serie (Table 38).¹⁶⁸

Autor	Año	Revista	Nº tumores	Métodos diagnósticos
Boursault y cols	2013 (Agosto)	<i>Plos One</i>	230 (88 pacientes)	HRM, Secuenciación Sanger (macrodissección); Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA + BenchMark XT+ DAB + Dilución: 1:100)
Menzies y cols	2014 (Marzo)	<i>Am J Surg Pathol</i>	171 (64 pacientes)	HRM; Secuenciación (macrodissección); Anti-VE1 (Spring Bioscience Pleasanton, CA + Ventana BenchMark ULTRA + DAB+ Dilución: 1:50)
Pearlstein y cols	2014 (Junio)	<i>J Cutan Pathol</i>	76 pacientes	Pirosecuenciación (macrodissección); Anti-VE1 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA + Leica Bond III+Leica Refined Red Polymer + Dilución: 1:100)
Nuestro estudio	2015 (Mayo)		146 (62 pacientes)	Cobas® BRAV600 Mutation Test, Secuenciación directa Sanger (macrodissección); Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton CA + BenchMark XT + DAB + Dilución: 1:100)

Tabla 38. Homogeneidad intertumoral

5.3. Homogeneidad intratumoral

La inmunohistoquímica es una técnica que de forma directa y fácil nos permite valorar en toda la muestra, si la tinción de la mutación de $BRAF^{V600E}$ se distribuye de forma homogénea. En la literatura, se ha objetivado heterogeneidad intratumoral en varios estudios en los que las técnicas empleadas han sido moleculares (Tabla 39).⁹³⁻⁹⁸ Lin y cols., al secuenciar entre 40 y 56 grupos de células de cinco melanomas primarios, encontraron que 4 de los 5 melanomas contenían grupos de células con BRAF de tipo silvestre y mutado. Para apoyar este hallazgo, realizaron un análisis en 10 melanomas

adicionales usando técnicas de mayor sensibilidad, detectando subclones en 8 de ellos.⁹³ Yancovitz y cols., en el mismo trabajo en que demostraron heterogeneidad intertumoral, estudiaron nueve casos de melanoma primario mediante microdissección y análisis con secuenciación y BRAFV600E-specific SNaPshot, con el fin de determinar si presentaban subclones tumorales diferentes en la superficie de un mismo tumor. Seis de estos casos mostraron según el área estudiada, heterogeneidad intratumoral con diferentes proporciones de células BRAF^{V600E} y de tipo silvestre.⁹⁵ Heirzenling y cols., solo refiere que un subgrupo de pacientes mostró heterogeneidad intratumoral, mediante IHQ (anticuerpo monoclonal de ratón VE1).⁹⁸ Wilmott y cols., estudiaron 66 pacientes con melanomas metastásicos con IHQ, de los cuales el 22% mostró una tinción heterogénea del anticuerpo.¹⁷³ Busam y cols., estudiaron en 20 melanomas primarios la mutación de *BRAF* con el anticuerpo VE1. En seis casos la tinción presentaba poblaciones V600E positivas y negativas en el mismo tumor. Aunque consideraron que podría existir heterogeneidad en la expresión del anticuerpo, aconsejaron prudencia en la interpretación, ya que podría ser debida a la presencia de artefactos por mala conservación de las muestras, cauterización o por la presencia de áreas necróticas. Además, también recomiendan en su trabajo, ser precavidos al evaluar la homogeneidad intratumoral, ya que en ocasiones en la muestra valorada, se podrían omitir áreas en las que podría existir subclones de células tumorales de tipo silvestre.⁹⁷

Autor	Año	Revista	Nº tumores	Métodos
Lin y cols.	Enero 2011	<i>Br J Cancer</i>	células de 5 melanomas/ 10 melanomas	Single/cell mutation analysis; secuenciación (microdissección)
Yancovitz y cols.	Enero 2012	<i>Plos One</i>	9	Laser capture microdissection + BRAF ^{V600E} -specific SNaPshot technology)
Willmot y cols.	Febrero 2013	<i>Br J Cancer</i>	58 pacientes (tratados con vemurafenib y dabrafenib)	Anti-VE1 (Spring Biosciences Pleasanton, CA + Ventana BenchMark XT+DAB)
Busam y cols.	Marzo 2013	<i>Am J Surg Pathol</i>	44	Anti-VE1 (DAB + Dilución:1:100); Sequenom Mass Array system (macrodissección)
Heinzerling y cols.	Noviembre 2013	<i>Br J Cancer</i>	En un subgrupo de pacientes estudia la heterogeneidad intratumoral	Anti-VE1 (Spring Biosciences Pleasanton, CA + Ventana March XT + DAB)
Chiappeta y cols.	Marzo 2015	<i>Appl Immunohistochem Mol Morphol</i>	15 pacientes	(microdissection) secuenciación

Tabla 39. Heterogeneidad intratumoral

En nuestra serie, analizamos 62 pacientes (62 melanomas primarios y 84 metástasis) mediante IHQ y demostramos la ausencia de heterogeneidad intratumoral. Por lo tanto, nuestros resultados corroboran la homogeneidad intratumoral, propuesta por otros autores (Tabla 40).^{42,79,100,101,167,174} En el trabajo de Boursault y cols. que estudiaron 99 pacientes (230 muestras), la mutación fue positiva en el 53% de los casos, y con IHQ en el 47,4%. Se observó disminución de la captación de la tinción en áreas de necrosis, o mal fijadas, y concluyeron que la tinción había sido homogénea en todas las muestras que estudiaron.¹⁰¹ Menzies y cols., estudiaron 64 pacientes (171 muestras tumorales) con IHQ y encontraron un 100% de concordancia intertumoral. Todas las tinciones fueron homogéneas y el 70% de forma intensa (62 melanomas primarios y sus 89 metástasis).¹⁶⁷

Autor	Año	Revista	Nº tumores	Métodos
Capper y cols.	2011	<i>Acta Neuropathol</i>	47	Secuenciación; Anti-VE1 (Ventana BenchMark XT + DAB)
Capper y cols.	2012	<i>Acta Neuropathol</i>	76	Secuenciación; Anti-VE1 (Ventana BenchMark XT + DAB)
Long y cols.	2013	<i>Am J Surg Pathol</i>	100 pacientes	Secuenciación de ADN bidireccional; PCR-HRM; Anti-VE1 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA+Ventana BenchMark XT + DAB)
Kristensen y cols.	2013	<i>J Mole Diagn</i>	83	qRT-PCR; pirosecuenciación (macrodissección)
Boursault y cols.	2013	<i>Plos One</i>	230 (88 pacientes)	Anti-VE1 (Spring Bioscience, Pleasanton CA, BenchMark XT + DAB + Dilución 1:100)
Menzies y cols.	2014	<i>Am J Surg Pathol</i>	171 (64 pacientes)	HRM; Secuenciación bidireccional de ADN (macrodissección); Anti-VE1 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA + Ventana BenchMark ULTRA + DAB + Dilución 1:50)
Kakavand y cols.	2014	<i>Pathology</i>	57 pacientes	IHQ VE1; Molecular testing (PCR, MALDI-TOF)
Nuestro estudio	2015		146 (62 pacientes)	Anti-VE1 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA + Ventana BenchMark ULTRA + DAB + Dilución 1:100)

Tabla 40. Homogeneidad intratumoral

En la interpretación de los resultados de la inmunotinción con el anticuerpo VE1, es importante, ante la sospecha de heterogeneidad, la correlación con los hallazgos de H&E, ya que la presencia de necrosis, y áreas en las que predomina el estroma, pueden generar errores de interpretación de tinción heterogénea como falsos positivos.^{101,175}

La tinción verde-grisácea con el anticuerpo VE1 con la que podemos ver los depósitos de melanina en los melanófagos y dentro de células tumorales, también podría ser otra causa de falso positivo.¹⁰¹ Yeh y cols. (2013), investigaron el impacto de las células del estroma en los resultados falsos negativos obtenidos por métodos moleculares. En un análisis de la frecuencia de BRAFV600E-mutado en nevus adquiridos por PCR digital (ddPCR), los autores identificaron inicialmente heterogeneidad en la mutación de *BRAF*^{V600E}. Sin embargo, cuando el análisis se ajustó para el grado de contaminación del estroma, las lesiones resultaron ser totalmente clonales para la mutación de *BRAF*^{V600E}.¹⁷⁵

5.4. Reactividad cruzada de Cobas® BRAV600 Mutation Test e IHQ

En el melanoma, existen mutaciones de dinucleótidos menos comunes que afectan al codón 600: V600K (1798 1799GT>AA), V600R (1798 1799GT >AG), V600D (799 1800AG>AT) V600E2 (1799 1800AG>AA), junto con otras mutaciones más raras que afectan a otros codones del gen *BRAF*. De acuerdo con la base de datos COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations In Cancer*), la variante más frecuente después de la V600E es la forma $BRAF^{V600K}$. Los inhibidores de BRAF han demostrado ser eficaces en el tratamiento del melanoma en aproximadamente el 48% de los pacientes V600E-mutado⁸⁹ y los estudios preclínicos iniciales mostraron que las líneas celulares que albergan mutaciones V600K, V600D, y V600R también son sensibles a vemurafenib.^{89,154,176} Puesto que estos datos indican que vemurafenib es activo en melanomas con la mutación V600K, los nuevos ensayos en los que se combinan dabrafenib y trametinib utilizan pruebas diagnósticas alelo específico para distinguir entre V600K y V600E. Además, se ha observado que el trametinib, inhibidor de MEK, parece ser activo en pacientes con activación $BRAF^{V600K}$, pero con menor eficacia.¹⁵⁰

El porcentaje de melanomas que poseen la mutación de $BRAF^{V600K}$ según los diferentes estudios es del 5-44% de los casos (Tabla 41).^{57,91,103,155,161} En nuestra serie, el número de casos en los que se detectó la mutación de $BRAF^{V600K}$ fue de un 9,5% (3/32) de los casos. Aunque podría haber más casos no detectados en el grupo de pacientes de nuestro estudio en los que el resultado de Cobas® BRAV600 Mutation Test y la IHQ fueron negativas, ya que la sensibilidad de la PCR para la forma V600K es inferior y en la IHQ no se ha encontrado una clara reactividad cruzada.⁹⁸

La forma $BRAF^{V600K}$ se ha asociado con características clínicopatológicas diferentes a la mutación de $BRAF^{V600E}$. Los melanomas que albergan la mutación V600K se encuentran en pacientes de mayor edad, en áreas de exposición crónica solar (cabeza y el cuello) y los tiempos de supervivencia libre de enfermedad son inferiores.^{60,98,161} En nuestra

muestra, la edad de diagnóstico del melanoma primario de los tres pacientes que presentaban la mutación de $BRAF^{V600K}$, casos 30, 40 y 42 fue de 48 años, 87 años y 70 años, respectivamente; la localización: caso 30: cuero cabelludo, caso 40: hombro derecho y caso 42: abdomen. Y el tipo de melanoma: caso 30: MES, caso: 40: MN y caso 42: MES. La menor sensibilidad Cobas® para la identificación de la mutación V600K también puede generar una tasa mayor de hallazgos discordantes cuando se utiliza este método. Las mutaciones V600K son detectadas por Cobas® en el 67% de los casos, y son negativos por IHQ.^{76,77,79} Halait y cols., en su serie con el Test Cobas detectaron las mutaciones V600D (1/1), V600E2 (1/3) y V600K (6/9) y no hallaron reactividad cruzada con la forma V600R.⁷⁶

Autor (año)	Nº total	V600E, n (%)	V600K, n (%)
Willmore-Payne y cols. (2005)	43	34 (79,1)	6 (14,0)
Edlundh-Rose y cols. (2006)	134	114 (85)	14 (10,4)
Ugurel y cols. (2007)	50	47 (94,0)	3 (6,0)
Long y cols. (2011)	95	70 (73,7)	19 (20,0)
Menzies y cols. (2012)	62	39 (62,9)	16 (25,8)
Pearlstein y cols. (2014)	34	27 (79,4)	7 (20,6)
Yaman y cols. (2015)	45	24 (53,3)	20 (44,4)
Thiel y cols. (2015)	44	41 (93,2)	3 (6,8)
Mar y cols. (2015)	196	77 (39)	10 (5)

Tabla 41. Frecuencia representativa de $BRAF^{V600K}$ en la literatura

En otros estudios, se ha comparado Cobas® con otros métodos moleculares, con el objetivo de optimizar el diagnóstico y valorar la capacidad de identificación de estas mutaciones V600-no E (Tabla 42). Heinzerling y cols., estudiaron la mutación de $BRAF$, en 276 muestras (174 pacientes) de melanoma mediante pirosecuenciación. El grupo de casos con mutaciones V600-no E fue confirmado por secuenciación capilar. Se compararon los resultados de Cobas® e IHQ (anti-VE1). En 14 pacientes (18,7%) se detectaron mutaciones raras: V600K, V600E2, V600D, V600G, V600R, V600EK601,

V600DK601, y L597S. Las mutaciones V600-no E detectaron de forma incompleta por Cobas®, solo en 7 pacientes. La IHQ con el anticuerpo-V600E específico (VE1) fue positiva para los tumores V600E2 y V600EK601 y negativa para V600D, L597S, V600R, y V600DK601. Las muestras detectadas por Cobas® fueron: V600K, L597S y V600R, V600E2(GAA), V600D y V600EK601. Las tasas globales de detección de las mutaciones raras: pirosecuenciación (pacientes 13/14-92,9%; muestras 42/44-95,5%); Cobas® (pacientes 7/14-50%; muestras 8/18-44%); e IHQ (pacientes 3/14-21,4%; muestras 5/18-27,8%). Concluyen que estos dos métodos diagnósticos, Cobas® e IHQ, no son muy fiables a la hora de identificar formas raras de la mutación V600.⁹⁸ Esto coincide con lo descrito por Skorokhod y cols..¹⁷⁷ En este artículo demostraron que la pirosecuenciación era un método seguro, reproducible que se puede combinar con Sanger para optimizar los resultados. Thiel y cols., en su serie no detectó reactividad cruzada del anticuerpo VE1 con mutación $BRAF^{V600K}$ (n=7). A diferencia de otras mutaciones raras, el anticuerpo VE1 sí detectó la mutación $BRAF^{V600E2}$, confirmado posteriormente con secuenciación directa Sanger.¹⁶⁰ Curiosamente, Ihle y cols., describieron reactividad cruzada de VE1 con la mutación $BRAF^{V600R}$ (1 V600R caso de 3).¹⁷⁸

Autor	Revista	Mutación
Ihle y cols. (2014)	<i>BMC Cancer</i>	$BRAF^{V600R}$ (1 caso)
Heinzerling y cols. (2013)	<i>Br J Cancer</i>	$BRAF^{V600K}$ (1 caso)
Thiel y cols. (2015)	<i>Hum Pathol</i>	$BRAF^{V600E2}$ (1 caso)
Lade-Keller y cols. (2013)	<i>J Clin Pathol</i>	$BRAF^{V600Ec}$ (1 caso)

Tabla 42. Reactividad cruzada de anti-VE1

5.5. Sensibilidad y especificidad

Autor	Año	S*	E*	Nº tumores	Métodos
Capper y cols.	2011	100%	100%	Anti-VE1 (Ventana BenchMark XT + DAB)	Secuenciación directa
Long y cols.	2013	97%	98%	Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA, USA + Ventana BenchMark XT + DAB)	PCR-HRM; PCR-mass espectrometría
Hofman y cols.	2013	96%	100%	-	Pirosecuenciación
Colomba y cols.	2013	100%	100%	TMA's + Bond- Max Fr4.0 + Leica Biosystem, Newcastle, UK)	Secuenciación Sanger; RT-PCR; pirosecuenciación
Busam y cols.	2013	100	100	Anti-VE1 (DAB + Dilución 1:100)	Sequenom Mass Array system
Boursault y cols.	2013	97,3%	100%	Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA + BenchMark XT + DAB + Dilución1:100)	PCR-HRM; Secuenciación Sanger
Routhier y cols.	2013	98%	97%	Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA + DAB)	SNAPshot
Marin y cols.	2013	90-93%	97-100%	Bond-Max Fr 4.0 (Leica Biosystem, Newcastle, United Kingdom + Bond Polymer Refine Red Detection kit (Leica Biosystem	Pirosecuenciación, Sanger; RT-PCR
Ihle y cols.	2014	100%	98%	Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA, USA + BOND Max immunostainer + Bond Polymer Refine Detection kit (Menarini, Berlin, Germany))	Sanger; HRM; allelic specific PCR; next generation sequencing
Menzies y cols.	2014	100%	100%	Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA + Ventana BenchMark ULTRA + DAB + Dilución 1:50)	PCR-HRM
Chen y cols.	2014	100%	92,9%	Anti-VE1 (NewEast Biosciences, Malvern, PA + Dilución:1:500)	Pirosecuenciación, ARMS-PCR
Pearlstein y cols.	2014	85%	100%	Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA + Leica Bond III + Leica Refined Red Polymer + Dilución: 1:100)	Pirosecuenciación
Liu y cols.	2014	72,2%	100%	Anti-VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA + DAB + Dilución 1:50)	Secuenciación Sanger
Fisher y cols.	2015			Anti-VE1 (Ventana BenchMark ULTRA + DAB)	RT-PCR (Cobas)
Thiel y cols.	2015	100%	96,8%	Anti-VE1 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA + BenchMark XT + DAB + Dilución1:100))	cMS

Tabla 43. Sensibilidad y especificidad de la IHQ frente a otras técnicas moleculares. S*: sensibilidad; E*: especificidad

La inmunohistoquímica es una técnica accesible, y más barata que las técnicas moleculares (un anticuerpo convencional vale 8 €, el VE1 es actualmente más caro 50 €, mientras que la técnica de Cobas®; cuesta aproximadamente 180 €). Se emplea en la rutina diaria de los laboratorios de patología y es un test rápido (permite la visualización directa de las células tumorales) y sensible. La IHQ puede acortar el período de detección de la mutación en aproximadamente 48 horas, lo que podría ahorrar tiempo para el inicio de los tratamientos. Hasta la actualidad la técnica *gold standard* ha sido la secuenciación Sanger®. Sin embargo, Sanger® es una técnica muy limitada para un análisis de rutina, los protocolos de elaboración son muy largos y necesitan una mayor calidad de la muestra (bajas concentraciones de infiltrado inflamatorio o de células del estroma).^{75,179} La cantidad de tumor mínima para una óptima detección de la mutación en el Cobas® es 15-20% y, en la secuenciación directa Sanger® del 40%.⁵⁶

Los estudios iniciales que se han efectuado con el anticuerpo monoclonal de ratón VE1, comparado con las técnicas genéticas (secuenciación directa Sanger®, pirosecuenciación, RT-PCR Cobas®, PCR-HRM, ARMS-PCR, cSM,... han alcanzado una alta sensibilidad y especificidad (Tabla 43).^{42,77,79,100,101} En nuestra serie, la sensibilidad y especificidad de la IHQ frente a Cobas® (considerando Cobas®; como *gold standard*) fue del 90,67% y del 84,62%, respectivamente, alcanzando un coeficiente kappa bueno (0,755). Si diferenciamos entre las formas V600, V600E y V600K, en nuestro caso la sensibilidad para la detección de BRAF^{V600E} aumenta considerablemente, siendo la sensibilidad, del 95,78%, y la especificidad, 83,87%. Y alcanzado un coeficiente kappa 0,834 (excelente). Este resultado concuerda con lo publicado.^{160,168,180} En nuestra serie, de los 3 pacientes que presentaban la mutación V600K, ninguno fue detectado por IHQ.

Long y cols, estudiaron en 100 pacientes (estadio IIIC y IV), la expresión de la mutación BRAF^{V600} mediante IHQ y secuenciación (HRM). Los resultados entre ambas pruebas en 5 casos fueron discrepantes. En dos de los casos, la técnica molecular fue inicialmente negativa y la IHQ positiva. Se repitió la secuenciación, siendo la mutación positiva por

lo que se concluyó que habían sido falsos negativos de la prueba genética. En otros dos casos positivos para V600E en el test molecular, y negativos para IHQ se confirmó que la mutación era la forma V600K. En el quinto caso, se repitió el test molecular que volvió a ser negativo, por lo que se concluyó que podría tratarse de un verdadero falso negativo. La sensibilidad y especificidad del anticuerpo frente a la secuenciación (HRM) fue 97% y 98%, respectivamente.⁷⁹ La sensibilidad (97,3%) y especificidad (100%) de la IHQ lograda en el trabajo de Boursault y cols. frente al HRM (PCR), también fue similar a los estudios previos. Los falsos negativos, fueron observados en áreas de necrosis y zonas adyacentes, explicando que estos artefactos podrían alterar la antigenicidad del epítipo.¹⁰¹

Pearlstein y cols., validaron la IHQ comparándola con la pirosecuenciación, en 76 pacientes de melanoma. El cromógeno utilizado fue el Leica Red polymer detection system y la dilución 1:100 (la dilución fue mayor que en otros estudios que se ha empleado 1:50, ó 1:5).^{42,79,168,181} Se graduó la intensidad de la tinción de 0 a 3+ (0: ausente; 1: débil; 2: moderada y 3: intensa). El coeficiente Kappa entre dermatopatólogos fue 1,00, y la concordancia del 100%. Sólo obtuvieron 3 casos discordantes, de los cuales, dos tenían dos primarios. Capper y cols. y Liu y cols.,^{42,181} también estudiaron la sensibilidad y especificidad del anticuerpo frente a la secuenciación directa clásica. El primer grupo obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100% mientras que Liu y cols.,¹⁸² obtuvo una sensibilidad inferior. En un total 84 casos de melanoma, aplicaron simultáneamente ambos test hallando una alta especificidad (100%) y una sensibilidad (72,2%). La concordancia entre ambas técnicas fue excelente (coeficiente kappa=0,801). Otros autores han descrito que la intensidad en los nevus preexistentes es menor que en las células tumorales del melanoma.^{50,97}

La inmunohistoquímica con el anticuerpo VE1 tiene algunas limitaciones, una de las principales es la no detección de otras formas de mutación de *BRAF*^{V600}, por ejemplo la forma V600K, presente hasta en un 5-30% de las series de melanomas y candidata a tratamiento con inhibidores de BRAF.⁹¹ Por lo que, si se emplease como técnica de *screening* inicial, precisaría una técnica molecular complementaria. En nuestro caso, se

utilizó como técnica complementaria Cobas®, técnica molecular de tipo cualitativo en la que los resultados que se obtienen son: mutado (no determina el tipo de mutación V600 identificada), no mutado, o no valorable. Ante un resultado negativo para IHQ y positivo para Cobas, podríamos esperar una forma de la mutación V600 no V600E, por ejemplo BRAF^{V600K},¹⁸³ aunque no se puede descartar totalmente un resultado falso positivo de la PCR. En nuestro trabajo, utilizamos también la secuenciación directa Sanger® como *gold standard* para establecer el tipo definitivo de mutación. Un algoritmo diagnóstico para detección de la mutación *BRAF* que incluyese IHQ, tendría que combinar una técnica molecular que identificase el resto de mutaciones.

La tinción de BRAF^{V600E} es citoplasmática, intensa y difusa.¹⁰¹ Esto es importante a la hora de validar esta prueba, ya que tinciones nucleares podrían llevar a un error en la interpretación de las muestras (falsos positivos). Otro error, se podría generar por la tinción de los melanófagos. Se ha observado que la melanina con el cromógeno adquiere en los melanófagos distinta coloración gris-verdosa a la tinción citoplasmática marrón del anticuerpo BRAF^{V600E} en las células tumorales, en ocasiones difícil de discernir. Para el revelado de la técnica, se utiliza un sistema sustrato-cromógeno de alta sensibilidad basado en la peroxidasa. La incubación de las secciones se realiza en una solución de 3,3'-diaminobezidina tetrahydrochloride (DAB), que tras la oxidación forma un producto final de color marrón en el punto del antígeno diana o ácido nucleico. En la mayoría de los trabajos revisados se ha utilizado este cromógeno.^{42,79,101,167} Algunos autores para evitar la posible confusión en aquellos tumores con gran cantidad de pigmento melánico que podría interferir en la interpretación de la positividad, han recomendado el empleo del cromógeno Fast Red (Fosfatasa alcalina). Este permite una mejor diferenciación de tinción en las muestras de melanoma con un cromógeno rojo en lugar de un cromógeno marrón.^{77,168}

El retraso en la fijación (sobre fijación), artefactos por la manipulación del tejido o incluso la coagulación quirúrgica también puede ocasionar errores al valorar las tinciones.^{100,184} Thiel y cols., en 102 melanomas observó en un primer análisis que 41 (40,2%) casos eran positivos para la mutación V600E. Dos de los casos comparados con

otra técnica molecular (cMS), revelaron que eran WT. Al reevaluar estos casos, uno presentaba una gran absorción de cromógeno por los macrófagos y el otro caso, teñía zonas necróticas dando la falsa impresión de células de melanoma positivas. Al repetir la tinción de una muestra representativa (sin cambiar el protocolo), ambos casos fueron claramente identificados como negativos en las células de melanoma. Las tinciones inespecíficas que se han observado usando este anticuerpo, se atribuyen a necrosis, plegado de la sección, y a problemas en la fijación.^{100,160,182,183} Por lo tanto, para el patólogo al examinar las secciones, los factores como la presencia de macrófagos, pigmento y la necrosis son cruciales ya que pueden conducir a una falsa interpretación del resultado de la tinción.^{50,97,168,173}

Chen y cols., compararon la IHQ frente a otra técnica molecular ARMS-PCR y pirosecuenciación en 38 melanomas. Los resultados de sensibilidad y especificidad frente a pirosecuenciación fueron del 100% y 94,1%, respectivamente. La concordancia entre ambos métodos fue del 95% de los casos. En el caso de ARMS-PCR, la sensibilidad fue del 87,5%, la especificidad del 92,9%, y la concordancia del 91,7%. La pirosecuenciación es un método estándar, pero tiene limitaciones, ya que demanda una alta calidad de los tejidos tumorales. Si utilizamos tejidos almacenados de forma inadecuada podrían dar lugar a diferentes grados de daño en el ADN, provocando insuficiente calidad de ADN en las muestras. Por otro lado, el método ARMS-PCR tiene una sensibilidad más alta que la pirosecuenciación, pero ARMS-PCR no puede detectar mutaciones distintas de las estudiadas. Además, el método ARMS-PCR precisa un tiempo más largo, requiere unos aparatos específicos, es caro, y no se adapta fácilmente a la mayoría de los laboratorios.¹⁸⁵

5.6. Valor pronóstico de la mutación *BRAF*^{V600} (supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad)

La presencia de la mutación de *BRAF* es un marcador de mal pronóstico en otros cánceres, como se ha descrito en el carcinoma papilar de tiroides y en el cáncer colorrectal.⁷⁹ En el melanoma, los biomarcadores que han demostrado tener influencia

en el pronóstico de la enfermedad son el espesor (índice de Breslow), la ulceración, la afectación ganglionar, LDH y el índice mitótico.^{38,161} Sin embargo, la relevancia de la mutación *BRAF* como marcador pronóstico independiente, en el comportamiento clínico y en la progresión de la enfermedad es un tema todavía sin aclarar. Las diversas publicaciones revisadas hasta la fecha, muestran resultados heterogéneos.^{53,141,144,186,187} Aunque, en algunos trabajos se ha mostrado una tendencia a una peor supervivencia de los pacientes metastásicos con la mutación de *BRAF*,^{36,140,142,143,188,189} en otros, no se ha encontrado ninguna asociación entre la presencia de *BRAF* y la supervivencia global en pacientes con enfermedad metastásica^{53,59,65,68,146,158,162,190-192} o el intervalo libre de enfermedad.^{36,65,146,158,162}

En nuestra serie, no se halló una diferencia significativa en la supervivencia global entre los pacientes que presentan la mutación *BRAF*^{V600}. En el análisis univariante no se pudo confirmar su influencia como factor pronóstico independiente. El grupo de trabajo de Long y cols., analizaron el intervalo de tiempo desde el diagnóstico de melanoma primario hasta la aparición de la primera metástasis a distancia, sus resultados no encontraron una diferencia significativa entre el grupo de pacientes mutados y sin la mutación. Sin embargo, la supervivencia media de los pacientes con melanoma metastásico recién diagnosticado que hallaron fue de 5,7 meses en los pacientes con *BRAF* no tratados con un inhibidor de *BRAF*, y de 8,5 meses en los pacientes con *BRAF* de tipo silvestre. La presencia de *BRAF* no tuvo impacto en el intervalo libre de enfermedad desde el diagnóstico de melanoma a la primera metástasis a distancia; aunque sugieren que podría haber afectado a la supervivencia.³⁶ A su vez, en otros estudios se ha sugerido que podría tratarse de un marcador de reducción de la supervivencia global¹⁸⁸ y de la disminución de la duración de respuesta al tratamiento con quimioterapia.¹⁹⁰ Por otra parte, en algunas publicaciones de series de pacientes con melanomas en estadio III, tras la resección de metástasis locorregionales, han demostrado que la mutación *BRAF* era un factor desfavorable.^{142,186,187} El grupo de trabajo de Picard y cols., tras estudiar 72 melanomas (32: *BRAF* positivo) en estadio III con ganglio centinela positivo, concluyeron que la presencia de la mutación *BRAF* era un indicador de mal pronóstico y propusieron que

se incluyese la mutación en la estadificación. Otros trabajos, presentan resultados diferentes en los que no llegan a esta conclusión.^{68,142}

Los melanomas seleccionados en nuestra serie, correspondían a 43 (69%) en estadio II, 8 (13%) en estadio I, 7 (11%) en estadio III y 1 (1,6%) en estadio IV. El número de trabajos de melanomas invasivos localizados (estadio I-II) es muy limitado^{68,144,188}, y la mayoría de los autores se centran en estadios avanzados metastásicos.^{193,161} Existen estudios en los que la presencia de la mutación *BRAF*^{V600E} en melanomas en estadios I-II, si que ha demostrado disminución en el intervalo libre de enfermedad, pero no en la supervivencia.^{142,142,194,195} En nuestro trabajo, no hemos hallado diferencias en la supervivencia libre de enfermedad entre pacientes sin la mutación o con ella.

El grupo de Ardekani y cols., en un metanálisis compuesto por cuatro estudios de melanoma (674 pacientes), estudiaron el pronóstico de la presencia mutación de *BRAF*. La mutación *BRAF* aumentaba el riesgo de mortalidad en pacientes con melanoma en 1,7 veces (IC 95%, 1,37-2,12).¹⁹⁶

Por otro lado, también se ha estudiado la asociación entre la mutación de *BRAF* y melanomas ulcerados, tumores con un alto índice mitótico y de rápido crecimiento, aunque con resultados contradictorios.^{33,68,141,188,189,197} Mar y cols., estudiaron a 196 pacientes con melanomas en estadios I-III con un seguimiento de 92 meses. La muestra estaba compuesta por 77 (39%) *BRAF*^{V600E}, 10 (5%) *BRAF*^{V600K} y 33 (17%) fueron *NRAS*. Al comparar el crecimiento de los melanomas *BRAF*^{V600E} observaron que era más lento que los WT y V600K y presentaban una supervivencia menor en los estadios iniciales; por lo que concluyeron que el estado de la mutación debía ser considerada un factor pronóstico en este grupo, en particular cuando se ha planteado la posibilidad de inclusión de estas nuevas moléculas como terapias adyuvantes, como en el reciente ensayo BRIM-8.^{161,198} En otro estudio de 814 melanomas primarios, Mar y cols. (2014) demostraron que mientras que los tumores con mutación *BRAF* son significativamente más delgados que los melanomas *BRAF* de tipo silvestre, son también más propensos a presentar metástasis ganglionares.¹⁹⁹ Estudios recientes en

melanomas con enfermedad metastásica han sugerido que los tumores con mutación *BRAF*^{V600K} tienen un fenotipo más agresivo.^{60,161,200}

Ardekani y cols., demostraron que la expresión de la proteína BRAF se incrementaba durante la progresión del melanoma. De esta forma, la intensidad de la expresión de BRAF está relacionada con el aumento del grosor del melanoma primario, estadios más avanzados y la ulceración. En los casos en los que el melanoma primario adquiría una intensa expresión de BRAF estaba asociado de forma significativa a menor supervivencia global y menos supervivencia libre de enfermedad a los 5 años. Estos autores observaron también un aumento gradual en la expresión de BRAF desde nevus displásicos, a melanoma primario y melanoma metastásico.⁵⁰

Otros autores como Cheng y cols., que estudiaron 6 biomarcadores de melanoma que pudiesen identificar un mayor riesgo de progresión de la enfermedad. Entre ellos, la expresión de la mutación de *BRAF* mediante IHQ, observaron que la mutación *BRAF* era un marcador pronóstico en estadios I-II. Demostraron que cuanto mayor es la expresión de BRAF en melanomas primarios en estadios I-II es más probable que el paciente experimente una menor supervivencia, lo que apoyaría los resultados hallados por el grupo de Safaee Arkani y cols..^{50,194} En nuestra serie, la mutación *BRAF* no ha sido un factor pronóstico independiente estadísticamente significativo y por tanto, no ha demostrado influencia alguna en la supervivencia global o en la supervivencia libre de enfermedad.

6. CONCLUSIONES

1. La presencia de la mutación $BRAF^{V600}$ se ha observado en el 61,29% de los melanomas primarios de nuestra serie, siendo su perfil clínicopatológico predominante de melanomas de extensión superficial, localizados en el tronco y en pacientes jóvenes.
2. El estudio de la mutación $BRAF^{V600E}$ en muestras pareadas de melanomas primarios y metástasis mediante qPCR y el anticuerpo VE1, ha demostrado homogeneidad intertumoral.
3. La expresión de la proteína $BRAF^{V600E}$ mediante inmunohistoquímica es homogénea en todos los casos. No hemos observado heterogeneidad intratumoral de la mutación $BRAF^{V600E}$.
4. La IHQ con el anticuerpo VE1 es una herramienta con una alta sensibilidad (95,78%) y especificidad (83,87%) para la detección de la proteína $BRAF^{V600E}$, cuando se compara con una técnica molecular, como qPCR (Cobas®).
5. La presencia de la mutación $BRAF^{V600E}$ en pacientes con melanomas metastásicos, no es un factor pronóstico independiente, en la supervivencia global, ni en la supervivencia libre de enfermedad.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Society, A. C. Detailed Guide: Skin Cancer-Melanoma (consultado Junio 2015). Disponible en: <http://www.cancer.org/cancer/skincancer/melanoma/detailedguide/index>.
- 2 Medica, S. E. d. O. Melanoma. (consultado Marzo 2015) <http://www.seom.org>.
- 3 Mayer JE, Swetter SM, Fu T, Geller AC. Screening, early detection, education, and trends for melanoma: current status (2007-2013) and future directions: Part I. Epidemiology, high-risk groups, clinical strategies, and diagnostic technology. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(4):e591-599e512
- 4 Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2014;383(9919):816-27.
- 5 Marquez-Rodas I, Martin Algarra S, Aviles Izquierdo JA, Custodio Cabello S, Martin M. A new era in the treatment of melanoma: from biology to clinical practice. *Clin Transl Oncol*. 2011. 13:787-92.
- 6 Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011; 24(5):879-97.
- 7 Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH Jr, et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(14):4218-22.
- 8 Wan PT, Granett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004; 116(6):855-67.
- 9 Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
- 10 Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, Karasarides M, Martin J, Niculescu-Duvaz D, et al. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res*. 2004;64(7):2338-42.
- 11 Chong H, Lee J, Guan KL. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J*. 2001;20(14):3716-27.
- 12 Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*. 2006;20(16):2149-82.
- 13 Botella-Estrada R, Sanmartín Jimenez O. New therapies targeting the genetic mutations responsible for different types of melanoma. *Actas dermo-sifiliogr*. 2010;101(5):394-400.
- 14 Society, A. C. American Society Cancer: Cancer Facts and Figures 2014 Atlanta. Disponible en: <http://www.cancer.org/acts/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-04251.pdf> (consultado Junio 2015).
- 15 Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*. 2009;27(1):3-9.
- 16 Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol*. 2014;170(1):11-19.

- 17 Institute, N. C. Surveillance: Epidemiology and End Results. Disponible en:<http://www.seer.cancer.gov/statfacts> (Consultado en Abril 2015).
- 18 Rios L; Nagore E, Lopez JL, Redondo P, Marti RM, Fernandez de Misa R, et al. Melanoma characteristics at diagnosis from the Spanish National Cutaneous Melanoma Registry: 15 years of experience. *Actas dermo-sifiliogr.* 2013;104(9): 789-99.
- 19 Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, Zeeb H, Greinet R, Breitbart EW, et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer.* 2013;132(2):385-400.
- 20 Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol.* 2000;(6)25:459-63.
- 21 Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control.* 2001;12:(1):69-82.
- 22 MacKie RM, Aitchison T. Severe sunburn and subsequent risk of primary cutaneous malignant melanoma in scotland. *Br J Cancer.* 1982;46(6):955-60.
- 23 Berwick M. Gene-environment interaction in melanoma. *Forum (Genova).* 2000;10(3):191-200.
- 24 Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet.* 1995;11(3):328-30.
- 25 Taylor NJ, Busam KJ, From L, Groben PA, Anton-Culver H, Cust AE, et al. Inherited variation at MC1R and histological characteristics of primary melanoma. *PloS One.* 2015;10(3):e0119920.
- 26 Aoude LG, Wadt KA, Pritchard AL, Hayward NK. Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell Melanoma Resh.* 2015;28(2):148-60.
- 27 Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet.* 2009;374(2):362-5.
- 28 McGovern VJ, Mihm MC JR, Bailly C, booth JC, Clark WH Jr, Cochran AJ, et al. The classification of malignant melanoma and its histologic reporting. *Cancer.* 1073;32(6):1446-57.
- 29 Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(24):1878-90.
- 30 Sasaki Y, Niu C, Makino R, Kudo C, Watanabe H, Matsunaga J, et al. BRAF point mutations in primary melanoma show different prevalences by subtype. *J Invest Dermatol.* 2004;123(1):177-83.
- 31 Lang J, MacKie RM. Prevalence of exon 15 BRAF mutations in primary melanoma of the superficial spreading, nodular, acral, and lentigo maligna subtypes. *J Invest Dermatol.* 2005;125(3):575-9.
- 32 Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2135-47.
- 33 Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):900-5.

- 34 Hodi FS, Corless CL, Giobbe-Hurder A, Fletcher JA, Zhu M, Marino Enriquez A, et al. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol*. 2013; 31(26):3182-90.
- 35 Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*. 2008;5(6):e120.
- 36 Long GV, Menzies AM, Nagrial SAM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1239-46.
- 37 Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011;164(4):776-84.
- 38 Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199-206.
- 39 Balch CM, Morton DL, Gershenwald JE, MacMasters KM, Nieweg OE, Powell B et al. Sentinel node biopsy and standard of care for melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60(5):872-5.
- 40 Cooper C, Wayne JD, Damstetter EM, Martini M, Gordon J, Guitart J, et al. A 10-year, single-institution analysis of clinicopathologic features and sentinel lymph node biopsy in thin melanomas. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(5):693-9.
- 41 Platero, S. *Molecular Pathology in drug Discovery and Development* Ed Wiley; 2009.
- 42 Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol*. 2011;122(1):11-19.
- 43 Pakneshan S, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology*. 2013;45(4):346-56.
- 44 Uribe P, Wistuba II, Gonzalez S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol*. 2003;25(5):365-70.
- 45 Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyak S, Cheng E, Bacchiocchi A, et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med*. 2010;8:67.
- 46 Thomas NE. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res*. 2006;16(2):97-103.
- 47 Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama K, Saida T, et al. Polyclonality of BRAF mutations in acquired melanocytic nevi. *J Natl Cancer Institut*. 2009; 101(20):1423-7.
- 48 Poynter JN, Elder JT, Fullen DR, Nair RP, Soengas MS, Johnson TM, et al. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res*. 2006; 16(4):267-73.

- 49 Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genet.* 2003; 33(1):19-20.
- 50 Safaee Ardekani G, Jafarnejad SM, Khosravi S, Martinka M, Ho V, Le G, et al. Disease progression and patient survival are significantly influenced by BRAF protein expression in primary melanoma. *Br J Dermatol.* 2013;169(2):320-8.
- 51 Greene VR, Johnson MM, Grimm EA, Ellerhorst JA. Frequencies of NRAS and BRAF mutations increase from the radial to the vertical growth phase in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(6):1483-8.
- 52 Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, et al. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010; 23(6):763-70.
- 53 Edlundh-Rose E, Egyhazi S, Omholt K, Mansson-Brahme E, Platz A, Jansson J, et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.* 2006;16(6):471-8.
- 54 Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126(1):154-60.
- 55 Wu J, Rosenbaum E, Begum S, Westra WH. Distribution of BRAF T1799A(V600E) mutations across various types of benign nevi: implications for melanocytic tumorigenesis. *Am J Dermatopathol.* 2007;29(6):534-7.
- 56 Spittle C, Ward MR, Nathanson KL, Gimotty PA, Rappaport E, Brose MS, et al. Application of a BRAF pyrosequencing assay for mutation detection and copy number analysis in malignant melanoma. *J Mol Diag.* 2007;9(9):464-71.
- 57 Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol.* 2005;36(5):486-93.
- 58 Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, et al. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(2):190-200.
- 59 Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, Gast A, Sucker A, Mueller-Berghaus J, et al. B-Raf and N-Ras mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PloS One.* 2007;2(2):e236.
- 60 Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Yhompson JF, et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(12):3242-9.
- 61 Jakob JA, Basserr RL, Ng, CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer.* 2012;118(16):4014-23.
- 62 Deichmann M, Thome m, Benner A, Kirschner M, Hassanzadeh J, Kurzen H, et al. Preponderance of the oncogenic V599E and V599K mutations in B-raf kinase domain is enhanced in melanoma cutaneous/subcutaneous metastases. *BMC Cancer.* 2005;5:58.

- 63 Albino AP, Le Strange R, Oliff AI, Furth ME, Old LJ. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity?. *Nature*. 1984; 308(5954):69-72.
- 64 Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene*. 1989; 4(11):363-74.
- 65 Devitt B, Liu W, Salemi R, Wolfe R, Kelly J, Tzen CY, et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(4):666-72.
- 66 Wu S, Kuo H, Li WQ, Canales AL, Han J, Qureshi AA. Association between BRAFV600E and NRASQ61R mutations and clinicopathologic characteristics, risk factors and clinical outcome of primary invasive cutaneous melanoma. *Cancer Causes Control*. 2014; 25(10):1379-86.
- 67 Ekedahl H, Cirenajwis H, Harbst K, Carneiro A, Nielsen K, Olsson H, et al. The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br J Dermatol*. 2013;169(5):1049-55.
- 68 Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011;17(22):29-35.
- 69 Flaherty KT, Hodi FS, Bastian BC. Mutation-driven drug development in melanoma. *Curr Opin Oncol*. 2010; 22(3):178-83.
- 70 Populo H, Soares P, Rocha AS, Silva P, Lopes JM. Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. *Melanoma Res*. 2010;20(2):107-17.
- 71 Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C Warrick A, Paterson J, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res*. 2008;14(21):6821-8.
- 72 Slipicevic A, Herlyn M. KIT in melanoma: many shades of gray. *J Invest Dermatology*. 2015;135(2):337-8.
- 73 Bellon E, Ligtenberg MJ, Tejpar S, Cox K, de Hertogh G, de Stricker K, et al. External quality assessment for KRAS testing is needed: setup of a European program and report of the first joined regional quality assessment rounds. *Oncologist*. 2011;16(4):467-78.
- 74 Kristensen T, Clemmensen O, Hoejberg L. Low incidence of minor BRAF V600 mutation-positive subclones in primary and metastatic melanoma determined by sensitive and quantitative real-time PCR. *J Mol Diagn*. 2013;15(3):355-61.
- 75 Anderson S, Bloom KJ, Vallera DU, Rueschoff J, Meldrum C, Schilling R, et al. Multisite analytic performance studies of a real-time polymerase chain reaction assay for the detection of BRAF V600E mutations in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(11):1385-91.
- 76 Halait H, Demartin K, Shah S, Soviero S, Langland R, Cheng S, et al. Analytical performance of a real-time PCR-based assay for V600 mutations in the BRAF

- gene, used as the companion diagnostic test for the novel BRAF inhibitor vemurafenib in metastatic melanoma. *Diagn Mol Pathol*. 2012;21(1):1-8.
- 77 Colomba E, Helias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, Marin C, Terrones N, Pechaud D, et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. *J Mol Diagn*. 2013;15(1):94-100.
- 78 Qu K, Pan Q, Zhang X, Rodriguez L, Zhang K, Li H, et al. Detection of BRAF V600 mutations in metastatic melanoma: comparison of the Cobas 4800 and Sanger sequencing assays. *J Mol Diagn*. 2013;15(6):790-5.
- 79 Long GV, Wilmott JS, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, et al. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(1):61-5.
- 80 Koelsche C, Wohrer A, Jeibmann A, Schittenhelm J, Schindler G, Preusser M, et al. Mutant BRAF V600E protein in ganglioglioma is predominantly expressed by neuronal tumor cells. *Acta neuropathol*. 2013;125(6):891-900.
- 81 Mordes DA, Lynch K, Campbell S, Dias-Santagata D, Nose V, Louis DN, et al. VE1 antibody immunoreactivity in normal anterior pituitary and adrenal cortex without detectable BRAF V600E mutations. *Am J Clin Pathol*. 2014;141(6):811-5.
- 82 Farzin M, Toon CW, Clarkson A, Sioson L, Gill AJ. BRAF V600E mutation specific immunohistochemistry with clone VE1 is not reliable in pituitary adenomas. *Pathology*. 2014;46(1):79-80.
- 83 Adackapara CA, Sholl L M, Barletta JA, Hornick JL. Immunohistochemistry using the BRAF V600E mutation-specific monoclonal antibody VE1 is not a useful surrogate for genotyping in colorectal adenocarcinoma. *Histopathology*. 2013;63(2):187-93.
- 84 Lasota J, Kowalik A, Wasag B, wang ZF, Felisiak-Golabek A, Coates T, et al. Detection of the BRAF V600E mutation in colon carcinoma: critical evaluation of the immunohistochemical approach. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(9):1235-41.
- 85 Kuan SF, Navina S, Cressman KL, Pai RK. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. *Hum Pathol*. 2014;45(3):464-72.
- 86 Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1999;17(9):2745-51.
- 87 Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 2000;18(1):158-66.
- 88 Avril MF, Aamdal S, Grob F, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol*. 2004;22(6):1118-25.
- 89 Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364(26):2507-16.

- 90 Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*. 2010; 467(7315):596-9.
- 91 McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol*. 2014;15(3):323-32.
- 92 Davis MJ, Schlessinger J. The genesis of Zelboraf: targeting mutant B-Raf in melanoma. *J Cell Biol*. 2012; 199(1):15-19.
- 93 Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama A, Saida T, et al. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. *Br J Cancer*. 2011;104(3):464-8.
- 94 Chiappetta C, Proietti I, Soccodato V, Puggioni C, Zaralli R, Pacini L, et al. BRAF and NRAS mutations are heterogeneous and not mutually exclusive in nodular melanoma. *App Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(3):172-7.
- 95 Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng, E, Shapiro RL, Berman RS, et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. *PloS One*. 2012;7(1):e29336.
- 96 Wilmott JS, Tembe V, Howle JR, Shrama R, Thompson JF, Rizos H, et al. Intratumoral molecular heterogeneity in a BRAF-mutant, BRAF inhibitor-resistant melanoma: a case illustrating the challenges for personalized medicine. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(12):2704-8.
- 97 Busam KJ, Hedvat C, Pulitzer M, von Deimling A, Jungbluth AA. Immunohistochemical analysis of BRAF(V600E) expression of primary and metastatic melanoma and comparison with mutation status and melanocyte differentiation antigens of metastatic lesions. *Am J Surg Pathol*. 2013; 37(3):413-20.
- 98 Heinzerling L, Baiter M, Kuhnappel S, Schuler G, Keikavoussi P, Agaimy A, et al. Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. *Br J Cancer*. 2013;109(11):2833-41.
- 99 Colombino M, Lissia A, Capone M, de Giorgi V, Massi D, Stanganelli I, et al. Heterogeneous distribution of BRAF/NRAS mutations among Italian patients with advanced melanoma. *J Transl Med*. 2013;11(1):202.
- 100 Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wohrer A, Hackl M, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol* 2012;123(2):223-33.
- 101 Boursault L, Haddad V, Vergier B, cappellen D, Verdon S, Bellocq JP, et al. Tumor Homogeneity between Primary and Metastatic Sites for BRAF Status in Metastatic Melanoma Determined by Immunohistochemical and Molecular Testing. *PloS One*. 2013;8(8):e70826.
- 102 Menzies AM, Haydu LE, Carlino MS, Azer MW, Carr PJ, Kefford RF, et al. Inter- and intra-patient heterogeneity of response and progression to targeted therapy in metastatic melanoma. *PloS one*. 2014;9(1):e85004.

- 103 Kudchadkar R, Paraiso KH, Smalley KS. Targeting mutant BRAF in melanoma: current status and future development of combination therapy strategies. *Cancer J*. 2012; 18(2):124-31.
- 104 Villanueva J, Vultur A, Herlyn M. Resistance to BRAF inhibitors: unraveling mechanisms and future treatment options. *Cancer Res*. 2011; 71(23):7137-40.
- 105 Hartsough E, Shao Y, Aplin AE. Resistance to RAF inhibitors revisited. *J Invest Dermatol*. 2014; 134(2):319-25.
- 106 Kugel CH, Aplin AE. Adaptive resistance to RAF inhibitors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014; 27(6):1032-8.
- 107 Paraiso KH, Fedorenko IV, Cantini LP, Munko AC, Hall M, Sondak VK, et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer*. 2010;102(12):1724-30.
- 108 Xing F, Persaud Y, Pratilas CA, Taylor BS, Janakiraman M, She QB, et al. Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene*. 2012;31(4):446-57.
- 109 Nathanson KL, Martin AM, Wubbenhorst B, Greshock J, Letrero R, D Andrea, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res*. 2013;19(17):4868-78.
- 110 Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*. 2012;487(7408):505-9.
- 111 Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*. 2012;87(7408):500-4.
- 112 Abel EV, Aplin AE. FOXD3 is a mutant B-RAF-regulated inhibitor of G(1)-S progression in melanoma cells. *Cancer Res*. 2010;70(7):2891-900.
- 113 Basile KJ, Abel EV, Aplin AE. Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells. *Oncogene*. 2012;31(19):2471-79.
- 114 Lito P, Pratilas CA, Joseph EW, Tadi M, Halilovic E, Zubrowski M, Huang A, et al. Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by RAF inhibitors attenuates their activity in BRAFV600E melanomas. *Cancer Cell*. 2012;22(5):668-82.
- 115 Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer Cell*. 2013;23(3):302-15.
- 116 Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell*. 2013;23(6):811-25.
- 117 Van Allen EM, Wagle N, Sucker A, Treacy DJ, Johannessen CM, Goets EM, et al. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. *Cancer Discov*. 2014;4:94-109.

- 118 Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010;468(7326):968-72.
- 119 Gibney GT, Smalley KS. An unholy alliance: cooperation between BRAF and NF1 in melanoma development and BRAF inhibitor resistance. *Cancer Discov*. 2013;3(3):260-3.
- 120 Whittaker SR, Theurillat JP, Van Allen E, Wagle N, Hsiao J, Cowlwy GS, et al. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discov*. 2013;3(3):350-62.
- 121 Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discov*. 2013;3(3):338-49.
- 122 Nissan MH, Pratilas CA, Jones AM, Ramirez R, Won H, Liu C, et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res*. 2014;74(8):2340-50.
- 123 Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther*. 2007;7(9):2876-83.
- 124 Paraiso KH, Xiang Y, rebecca VW, Abel EV, Chen YA, Munko AC, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res*. 2011;71(7):2750-60.
- 125 Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutsin TE, et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(14):1767-74.
- 126 Spagnolo F, Ghiorzo P, Orgiano L, Pastorino L, Picasso V Tornari E, et al. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *OncoTargets Ther*. 2015;8:157-68.
- 127 Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010;468(7326):973-7.
- 128 Poulidakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature*. 2011;480(7377):387-90.
- 129 Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun*. 2012;3:724.
- 130 Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):3085-96.
- 131 Shi H, Moriceau G, Kong X, Koya RC, Nazariab R, Pupo GM, et al. Preexisting MEK1 exon 3 mutations in V600E/KBRAF melanomas do not confer resistance to BRAF inhibitors. *Cancer Discov*. 2012;2(5):414-24.
- 132 Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*. 2014;508(7494):118-22.

- 133 Girotti MR, Marais R. Deja Vu: EGF receptors drive resistance to BRAF inhibitors. *Cancer Discov.* 2013;3(5):487-90.
- 134 Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlinos MS, Fung C Hyman J, et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):1965-77.
- 135 Shi H, Moriceau G, Kong X, Koya RC, Nazariab R, Pupo GM, et al. Preexisting MEK1 exon 3 mutations in V600E/KBRAF melanomas do not confer resistance to BRAF inhibitors. *Cancer Discov.* 2012;2(5):414-24.
- 136 Emery CM, Vijayendran KG, Zipser Mc, Sawyer AM, niu L, Kim JJ, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(48):20411-6.
- 137 Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res.* 2008;68(12):4853-61.
- 138 Shi H, Hong A, Kong X, Koya RC, Song C Moriceau G, et al. A novel AKT1 mutant amplifies an adaptive melanoma response to BRAF inhibition. *Cancer Discov.* 2014;4(1):69-79.
- 139 Lemech C, Infante J, Arkenau HT. Combination molecularly targeted drug therapy in metastatic melanoma: progress to date. *Drugs.* 2013;73(8):767-77.
- 140 Houben R, Becker JC, Kappel A, Terheyden P, Brocker EB Goetz R, et al. Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. *J Carcinog.* 2004;3(1):6.
- 141 Meckbach D, Bauer J, Pflugfelder A, Meier F, Busch C, Eigentler TK, et al. Survival according to BRAF-V600 tumor mutations--an analysis of 437 patients with primary melanoma. *PloS One.* 2014;9(1):e86194.
- 142 Picard M, Pham Dang N, D'Incan M, Mansard S, Dechelotte P, Pereira B, et al. Is BRAF a prognostic factor in stage III skin melanoma? A retrospective study of 72 patients after positive sentinel lymph node dissection. *Br J Dermatol.* 2014;171(1):108-14.
- 143 Barbour AP, Tang YH, Armour N, Dutton-Regester K, Krause L, Loffler KA, et al. BRAF mutation status is an independent prognostic factor for resected stage IIIB and IIIC melanoma: implications for melanoma staging and adjuvant therapy. *Eur J Cancer.* 2014;50(15):2668-76.
- 144 Nagore E, Requena C, Traves V, Guillen C, Hayward NK, Whiteman DC, et al. Prognostic value of BRAF mutations in localized cutaneous melanoma. *Am Acad Dermatol.* 2014;70(5):88-862.
- 145 Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, Menzies AM, Hamilton AL, Yu B, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 2014;111(2):292-9.
- 146 Rutkowski P, Gos A, Jurkowska M, Switaj T, Dziewirski W, Zdzenicki K, et al. Molecular alterations in clinical stage III cutaneous melanoma: Correlation with clinicopathological features and patient outcome. *Oncoly Lett.* 2014;8(1):47-54.
- 147 Hernandez-Losa J. Recomendaciones para la determinación de mutaciones de K-RAS en cáncer de colon. *Rev Esp Patol.* 2012;45:76-85.

- 148 Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Satagada D, Hiscks DJ, et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PloS One*. 2012;7(4): e35309.
- 149 Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N England J Med*. 2012;367(18):1694-703.
- 150 Schadendorf D, Amonkar MM, Stroyakovskiy D, Levchenko E, Gogas H, de Braud F, Grob JJ, et al. Health-related quality of life impact in a randomised phase III study of the combination of dabrafenib and trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with BRAF V600 metastatic melanoma. *Eur J Cancer*. 2015;51(7):833-40.
- 151 Gonzalez D, Fearfield L, Nathan P, Taniere P, Wallace A, Brown E, et al. BRAF mutation testing algorithm for vemurafenib treatment in melanoma: recommendations from an expert panel. *Br J Dermatol*. 2013;168(4):700-7.
- 152 Clark RR, Garioch JJ, Moncrieff MD. Concerns regarding BRAF testing algorithm. *Br J Dermatol*. 2013;169(5):1167-8.
- 153 Van Akkooi AC, Nijsten T. A costly revolution for a subgroup of patients with metastatic melanoma. *Br J Dermatol*. 2013;168(3):467-70.
- 154 Trudel S, Odolczyk N, Dremaux J, Toffin J, Regnier A, Sevestre H, et al. The clinical response to vemurafenib in a patient with a rare BRAFV600DK601del mutation-positive melanoma. *BMC Cancer*. 2014;14:727.
- 155 Yaman B, Akalin T, Kandiloglu G. Clinicopathological characteristics and mutation profiling in primary cutaneous melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2015;37(5):389-97.
- 156 Thomas NE, Kanetsky PA, Begg CB, Conway K, Berwick M. Melanoma molecular subtypes: unifying and paradoxical results. *J Invest Dermatol*. 2010;130(1):12-14.
- 157 Bauer J, Buttner P, Murali R, Okamoto I, Kolaitis NA, Landi MT, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;24(2):345-51.
- 158 Saint-Jean M, Quereux G, Nguyen JM, Peuvrel L, Brocard A, Vallee A, et al. Younger age at the time of first metastasis in BRAF-mutated compared to BRAF wild-type melanoma patients. *Oncol Rep*. 2014;32(2):808-14.
- 159 Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In vivo*. 2014;28(6):1005-11.
- 160 Thiel A, Moza m, Kytola S, Orpana A, Jahkola T, Hernberg M, et al. Prospective immunohistochemical analysis of BRAF V600E mutation in melanoma. *Hum Pathol*. 2015;46(2):169-75.
- 161 Mar VJ, Liu W, Devitt B, Wong, SQ, Dobrovic A, McArthur GA, et al. The role of BRAF mutations in primary melanoma growth rate and survival. *Br J Dermatol*. 2015;173(1):76-82.
- 162 Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DS. Incidence of BRAF oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanomas. *Clin cancer Res* 2014;10(5):1753-7.

- 163 Bernards R, Weinberg RA. A progression puzzle. *Nature*. 2002;418(86900):823.
- 164 Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews p, Rodgers L, Mcindoo J, et al. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature*. 2011;472(7341):90-4.
- 165 Katona TM, Jones TD, Wang M, Eble JN, Billongs SD, Cheng L. Genetically heterogeneous and clonally unrelated metastases may arise in patients with cutaneous melanoma. *Am J Surgical Pathol*. 2007;31(7):1029-37.
- 166 Richtig E, Schrama D, Ugurel, Fried I, Niederkorn A, Massone C, et al. BRAF mutation analysis of only one metastatic lesion can restrict the treatment of melanoma: a case report. *Br J Dermatol*. 2013;168(2):428-30.
- 167 Menzies AM, Lum T, Wilmott JS, Hyman J, Jefford RF, Thompson JF, et al. Intrapatient homogeneity of BRAFV600E expression in melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(3):377-82.
- 168 Pearlstein MV, Zedek DC, Ollila DC, Treece A, Gulley ML, Groben PA, et al. Validation of the VE1 immunostain for the BRAF V600E mutation in melanoma. *J Cutan Pathol*. 2014;41(9):724-32.
- 169 Saroufim M, Habib, Gerges R, Saab J, Loya A, Amr SS, et al. Comparing BRAF mutation status in matched primary and metastatic cutaneous melanomas: implications on optimized targeted therapy. *Exp Mol Pathol*. 2014;97(3):315-20.
- 170 Bradish JR, Richey JD, Post KM, Meehan K, sen JD, Malek AJ, et al. Discordancy in BRAF mutations among primary and metastatic melanoma lesions: clinical implications for targeted therapy. *Modern Pathol*. 2015;28(4):480-6.
- 171 Lade-Keller J, Romer KM, Guidberg P, Riber-Hansen R, Steiniche T, et al. Evaluation of BRAF mutation testing methodologies in formalin-fixed, paraffin-embedded cutaneous melanomas. *J Mol Diagn*. 2013; 15(1):70-80.
- 172 Lade-Keller J, Kristensen LS, Riber-hansen R, Guldberg P, Hansen LL Steiniche T, et al. A role for immunohistochemical detection of BRAF V600E prior to BRAF-inhibitor treatment of malignant melanoma?. *J Clin Pathol*. 2013;66(8):723-5.
- 173 Wilmott JS, Menzies AM, Haydu LE, Capper D, Preusser M, Zhang YE, et al. BRAF(V600E) protein expression and outcome from BRAF inhibitor treatment in BRAF(V600E) metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2013;108(4):924-31.
- 174 Kakavand H, Scolyer RA, Thompson JF, Mann GJ. Identification of new prognostic biomarkers for Stage III metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology*. 2013;2(9):e25564.
- 175 Yeh I, von Deimling A, Bastian BC. Clonal BRAF mutations in melanocytic nevi and initiating role of BRAF in melanocytic neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(12):917-9.
- 176 Yang H, Higgins B, Kolinsky K, Packman K, Go Z, Iyer R, et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res*. 2010;70(13):5518-27.
- 177 Skorokhod A, Capper D, von Deimling A, Enk A, Helmbold P. Detection of BRAF V600E mutations in skin metastases of malignant melanoma by monoclonal antibody VE1. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(3):488-91.
- 178 Ihle MA, Fassunke J, Konig K, Grunewald I, Schlaa M, Kreuberg N, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sange

- sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. BMC cancer. 2014;14:13.
- 179 Sullivan RJ, Flaherty KT. BRAF in Melanoma: Pathogenesis, Diagnosis, Inhibition, and Resistance. J Skin Cancer. 2011;2011:423239.
- 180 Marin C, Beauchet A, capper D, Zimmermann U, Julie C, Ilie M, et al. Detection of BRAF p.V600E Mutations in Melanoma by Immunohistochemistry Has a Good Interobserver Reproducibility. Arch Pathol Lab Med. 2013;138(1):71-5
- 181 Andrusis M, Penzel R, Weichert W, von Deimling A, Capper, D. Application of a BRAF V600E mutation-specific antibody for the diagnosis of hairy cell leukemia. Am J Surgical Pathol. 2012; 36(12):1796-800.
- 182 Liu H, LiZ, Wang y, Feng Q, Si L, Cui C, et al. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in melanoma patients with monoclonal antibody VE1. Pathol Int. 2014;64(12):601-6.
- 183 Fisher KE, Cohen C, Siddiqui MT, palma JF, Lipford EH, Longshore JW. Accurate detection of BRAF p.V600E mutations in challenging melanoma specimens requires stringent immunohistochemistry scoring criteria or sensitive molecular assays. Hum Pathol. 2014;45(11):2281-93.
- 184 Ilie M, Long E, Hofman V, Dadone B, Marquette Ch, Mouroux J, Vignaud JM, et al. Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAFV600E mutation in primary lung adenocarcinoma Caucasian patients. Ann Oncol. 2013; 24(3):742-8.
- 185 Chen Q, Xia C, Deng Y, Wang M, Luo P, Wu C, et al. Immunohistochemistry as a quick screening method for clinical detection of BRAF(V600E) mutation in melanoma patients. Tumour Biol. 2014;35(6):5727-33.
- 186 Moreau S, Saiga P, Aegetrer P, Bosset D, Longvert C, Helias-Rodzewicz Z, et al. Prognostic value of BRAF(V(6)(0)(0)) mutations in melanoma patients after resection of metastatic lymph nodes. Ann Surgl Oncol. 2012; 19(13):4314-21.
- 187 Mann GJ, Pupo GM, Campain AE, Carter CD, Sachramm SJ Pianova S, et al. BRAF mutation, NRAS mutation, and the absence of an immune-related expressed gene profile predict poor outcome in patients with stage III melanoma. J Invest Dermatol. 2013;133(2):509-17.
- 188 Si L, Kong Y, Xu X, Flaherty KT, Sheng X, Cui C, et al. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. Eur J Cancer. 2012; 48(1):94-100.
- 189 Jovanovic B, Krokkel D, Linden D, Nilsson B, Egyhazi S, Hansson J. Lack of cytoplasmic ERK activation is an independent adverse prognostic factor in primary cutaneous melanoma. J Invest Dermatol. 2008;128(11):2696-704.
- 190 Kumar R, Angelini S, Czene K, Sauroja I, Hahka-Kemppinen M,Pyrrhonen S, et al. et al. BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. Clin Cancer. 2003;9(9):3362-8.
- 191 Chang DZ, Panageas KS, Osma I, Polsky D, Busam K, Chapman PB. Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma. J T Med. 2004;2(1):46.
- 192 Akslen LA, Angelini S, Straume O, Bachmann IM, Molven A, Hemminki K, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not

- associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol*. 2005;125(2):312-7.
- 193 El-Osta H, Falchook G, Tsimberidou A, Hong D, Naing A, Kim K, et al. BRAF mutations in advanced cancers: clinical characteristics and outcomes. *PloS one*. 2011;6(10):e25806.
- 194 Cheng Y, Lu J, Chen G, Ardekani GS, Rotte A, Martinka M, et al. Stage-specific prognostic biomarkers in melanoma. *Oncotarget*. 2015;6(6):4180-9.
- 195 Meckbach D, Kaim U, Richter S, Leiter U, Eigentler TK Baouer J, et al. BRAF-V600 mutations have no prognostic impact in stage IV melanoma patients treated with monochemotherapy. *PloS One*. 2014;9(2):e89218.
- 196 Safaee Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, Saeedi A, Li G. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2012;7(10):e47054.
- 197 Grob JJ, Richard MA, Gouvernet J, Avril MF, Deaunay M, Wolkenstein P, et al. The kinetics of the visible growth of a primary melanoma reflects the tumor aggressiveness and is an independent prognostic marker: a prospective study. *Int J Cancer*. 2002;102(1):34-8.
- 198 Gonzalez D, Fearfield L, Nathan P, Taniere P, Wallace A, Brown E, et al. Concerns regarding BRAF testing algorithm: reply from authors. *Br J Dermatol*. 2013;169(5):1168-70.
- 199 Mar VJ, Wong SQ, Logan A, Nguyen T, Cebon J, Jelly JW, et al. Clinical and pathological associations of the activating RAC1 P29S mutation in primary cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014; 27(6):1117-25.
- 200 Bucheit AD, Syklawer E, Jakob JA, Basset RL Jr, Curry JL, et al. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer*. 2013;119: 3821-9.

Intra- and Inter-Tumoral Homogeneity of BRAF^{V600E} Mutations in Melanoma Tumors

Erica Riveiro-Falkenbach¹, Cándida A. Villanueva¹, María C. Garrido¹, Yolanda Ruano¹, Rosa M. García-Martín¹, Elena Godoy², Pablo L. Ortiz-Romero³, Juan J. Ríos-Martín⁴, Angel Santos-Briz⁵ and José L. Rodríguez-Peralto¹

The era of targeted therapy has introduced a new therapeutic perspective for melanoma patients. Treatment with BRAF^{V600} inhibitors has improved overall and disease-free survival in metastatic melanoma patients whose tumors harbor BRAF^{V600E} mutations. Although the BRAF^{V600E} mutation appears to have a critical role in tumor initiation, its expression during tumor progression remains controversial. In fact, various authors claim that BRAF^{V600E} heterogeneity is evident in melanoma tumors. Herein, we investigated the pattern of BRAF^{V600E} expression in matched primary and metastatic samples from 140 patients. Using a combination of real-time PCR and immunohistochemical analyses, we demonstrated that BRAF^{V600E} expression is homogeneous in melanoma tumors and hypothesized that the heterogeneity described by others might be attributable to technical issues when molecular methods are used. We also demonstrated the high efficiency of the anti-BRAF^{V600E} VE1 antibody for the detection of BRAF^{V600E} mutations in melanoma tumors.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 16 July 2015; doi:10.1038/jid.2015.229

INTRODUCTION

The new era of targeted therapies has increased treatment efficacy with less overall toxicity in patients with cancer. The v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 gene (BRAF) is the target of somatic mutations in 40–60% of melanoma patients (Goel *et al.*, 2006; Ribas and Flaherty, 2011). The most common mutations detected in the BRAF gene are BRAF^{V600E} (~80%) and BRAF^{V600K} (5–30% of the cases; McArthur *et al.*, 2014).

Emerging therapies that target the mutated BRAF^{V600} oncogene have improved overall and disease-free survival rates in patients with advanced melanoma that harbor BRAF^{V600E} and BRAF^{V600K} mutations (Chapman *et al.*, 2011; Kudchadkar *et al.*, 2012; McArthur *et al.*, 2014). In fact, the use of selective BRAF^{V600} inhibitors in patients with metastatic melanoma leads to high response rates with a relative reduction in the risk of death and disease progression compared

with dacarbazine (Chapman *et al.*, 2011; McArthur *et al.*, 2014). Regardless of this initial response to BRAF^{V600} inhibitors, most patients relapse in clinical practice. Indeed, complete response rates are rarely obtained, and many patients are refractory to this treatment (Chapman *et al.*, 2011; Sosman *et al.*, 2012).

Although the BRAF^{V600E} mutation appears to have a critical role in tumor initiation, consistent BRAF^{V600E} expression during melanoma progression is controversial, and recent studies have demonstrated the presence of BRAF^{V600E} heterogeneity in melanoma tumors (Colombino *et al.*, 2012; Yancovitz *et al.*, 2012; Heinzerling *et al.*, 2013; Saint-Jean *et al.*, 2014). The presence of inter-tumoral (differences between primary and metastatic tumors) or intra-tumoral (differences among different subclones within the tumor) heterogeneity of the BRAF^{V600E} mutation in melanoma might be an intrinsic mechanism of resistance to BRAF^{V600} inhibitors. Furthermore, tumor heterogeneity might lead to diagnostic problems in clinical practice (e.g., sample selection and BRAF^{V600} mutation detection using a primary or a metastatic melanoma specimen).

Different molecular methods are available to detect BRAF^{V600} mutations (Curry *et al.*, 2012). For instance, the cobas 4800 BRAF^{V600} Mutation Test (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) has been used for patient management in most countries. Recently, a monoclonal antibody against BRAF^{V600E} has been developed to detect this mutated protein in tumor paraffin sections (Capper *et al.*, 2011). Studies of melanoma tumors that harbor the BRAF^{V600E} mutation revealed high antibody sensitivity and specificity (Capper *et al.*, 2012; Skorokhod *et al.*, 2012; Colomba *et al.*, 2013).

¹Department of Pathology, Medical School, Universidad Complutense, Instituto i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ²Department of Dermatology, Hospital Universitario de Salamanca, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain; ³Department of Dermatology, Medical School, Instituto i+12, Universidad Complutense, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain; ⁴Department of Pathology, Hospital Virgen Macarena, Sevilla, Spain and ⁵Department of Pathology, Hospital Universitario de Salamanca, Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

Correspondence: José L. Rodríguez-Peralto, Department of Pathology, Medical School, Universidad Complutense, Instituto i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda. de Córdoba s/n, Madrid 28041, Spain. E-mail: jrperalto@salud.madrid.org

Received 19 December 2014; revised 12 May 2015; accepted 26 May 2015; accepted article preview online 17 June 2015

Trabajo presentado en:

1. Estudio comparativo entre el test Cobas® 4800 BRAF^{V600} y la inmunohistoquímica anti-BRAF^{V600E} para la detección de la mutación BRAF en muestras de melanoma. **Congreso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica SEAP-IAP, Santander, España (2015).**
2. Homogeneidad intra e inter-tumoral de la mutación BRAF^{V600E} en melanoma. **Congreso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica SEAP-IAP, Santander, España (2015).**
3. Intra e Inter-tumoral homogeneidad de la Mutación BRAF^{V600E} en Melanoma. **43 Congreso Nacional de Dermatología y Venereología, Sevilla, España (2015).**
4. Homogeneidad Intertumoral de la Expresión de la Mutación BRAF^{V600E} en el Melanoma. **XX Congreso Ibero Latinoamericano de Dermatología, Rio de Janeiro (2014).**
5. *Is BRAF^{V600} Expression Heterogeneous in Melanoma Tumors?* **10th International Melanoma Congress of the Society for Melanoma Research, Philadelphia, EEUU (2013).**
6. ¿Hay Heterogeneidad de la Expresión de la Mutación BRAFV600E en el melanoma? **XXXIX Reunión del Grupo Español de Dermatopatología, Alicante, España (2013).**